



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Phytosteroloxidaionsprodukten auf  
oxidative Parameter des Humanblutes (in vitro)

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Verfasserin:	Isolde WASTIAN
Matrikel-Nummer:	0200227
Studienrichtung (lt. Studien- blatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	A.o. Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz WAGNER

Wien, im Mai 2009



## **DANKSAGUNG**

Ein ganz großer Dank geht an A.o. Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung während der Arbeit im Labor, die Hilfe bei der statistischen Auswertung, die gute wissenschaftliche Kommunikation und für die vielen aufbauenden Worte zwischendurch.

Bei Mag. Karin Koschutnig möchte ich mich für die tolle Unterstützung während der praktischen Arbeit im Labor und der Diplomarbeitsverfassung bedanken. Auch für die fachlichen Auskünfte und für ihr stets offenes Ohr sage ich danke.

Den Mitarbeitern des Institutes für Ernährungswissenschaften danke ich für deren Zeit, die sie aufgewandt haben, um mich während meiner Arbeit im Labor zu unterstützen.

An meine drei Mädels, die wirklich gute Freundinnen geworden sind, Elisabeth Müllner, Sonja Kanzler und Verena Hasenegger geht ein ganz großes Dankeschön für die tolle Zeit im „Damenabteil“ und die seelische Unterstützung während der Verfassung dieser Arbeit.

Weiters möchte ich mich bei meiner Studienkollegin Marlies Wallner für die tolle Studienzeit bedanken.

Stefan & Vroni danke ich für die stets erfolgreiche telefonische Unterstützung während meines Studiums.

Ein großer Dank geht auch an meine zahlreichen fleißigen Korrekturleser/innen.

Einen wesentlichen Anteil am Erreichen meiner Ziele haben auch meine Eltern und meine Schwester Daniela, die mich während meines Studiums finanziell unterstützten und immer an mich glauben. Danke für euer Dasein und eure Liebe.

Auch den Eltern meines Freundes und meiner restlichen Familie danke ich recht herzlich für alles.

Zu guter letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Freund Wolfgang, der Liebe meines Lebens, bedanken. Vieles wurde während meines Studiums durch deine Unterstützung leichter. Ohne dich wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

## INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VII
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....	1
2. LITERATURÜBERBLICK .....	3
2.1 Geschichtlicher Hintergrund .....	3
2.2 Phytosterole .....	4
2.2.1 Struktur und natürliches Vorkommen von Phytosterolen .....	4
2.2.2 Stoffwechsel .....	7
2.2.3 Funktionelle Lebensmittel .....	9
2.2.4 Einfluss von Phytosterolen auf den Cholesterol- und Carotinoidspiegel .....	10
2.3 Oxidationsprodukte von Phytosterolen .....	14
2.3.1 Allgemein .....	14
2.3.2 Oxidation .....	15
2.3.3 Struktur und Gehalt von POPs in Lebensmitteln .....	16
2.3.4 Biologische Effekte von POPs und COPs .....	17
3. MATERIAL UND METHODEN .....	19
3.1 Studiendesign .....	19
3.2 Herkunft der Proben .....	19
3.3 Verwendete Proben .....	19
3.4 Herstellung der Test-Lösung .....	20
3.5 Probanden .....	20
3.6 Untersuchungsparameter .....	21
3.7 Probenvorbereitung .....	21
3.7.1 Zugabe der Phytosteroloxidationsprodukte .....	21
3.7.2 Gewinnung von Plasma .....	22

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.8	Vorversuch mit verschiedenen Lösungsmitteln .....	23
3.8.1	Ergebnisse .....	23
3.9	Vorversuch mit einer Probandin.....	23
3.9.1	Ergebnisse .....	24
3.10	Hauptversuch.....	24
3.10.1	Malondialdehyd MDA .....	24
3.10.1.1	Prinzip .....	25
3.10.1.2	Geräte .....	25
3.10.1.3	Reagenzien .....	25
3.10.1.4	Durchführung.....	27
3.10.1.5	Auswertung .....	28
3.10.2	Totale antioxidative Kapazität TAC .....	29
3.10.2.1	Prinzip .....	29
3.10.2.2	Geräte .....	29
3.10.2.3	Reagenzien .....	30
3.10.2.4	Durchführung.....	32
3.10.2.5	Auswertung .....	32
3.10.3	Ferric Reducing Antioxidant Power Assay FRAP .....	33
3.10.3.1	Prinzip .....	33
3.10.3.2	Geräte .....	33
3.10.3.3	Reagenzien .....	33
3.10.3.4	Durchführung.....	36
3.10.3.5	Auswertung .....	39
3.10.4	Hämoglobin .....	40
3.10.4.1	Prinzip .....	40
3.10.4.2	Geräte .....	40
3.10.4.3	Reagenzien .....	40
3.10.4.4	Durchführung.....	40
3.10.4.5	Auswertung .....	41
3.11	Statistische Auswertung.....	41
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	42

4.1	Hämoglobin.....	43
4.1.1	Gesamtergebnisse der Hämoglobinbestimmung.....	43
4.1.2	Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation .....	45
4.1.3	Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation.....	46
4.2	Malondialdehyd-MDA .....	48
4.2.1	Gesamtergebnisse von MDA.....	48
4.2.2	Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation .....	50
4.2.3	Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation.....	51
4.3	Totale antioxidative Kapazität TAC.....	53
4.3.1	Gesamtergebnisse von TAC.....	53
4.3.2	Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation .....	54
4.3.3	Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation.....	55
4.4	Ferric Reducing Antioxidant Power Assay FRAP .....	56
4.4.1	Gesamtergebnisse von FRAP .....	56
4.4.2	Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation .....	57
4.4.3	Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation.....	58
5.	SCHLUSSBETRACHTUNG.....	59
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
7.	SUMMARY .....	62
	LITERATURVERZEICHNIS.....	63

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Cholesterolstrukturformel im Vergleich zu einem Phytosterol ...	4
Abbildung 2:	Squalen Strukturformel .....	5
Abbildung 3:	Stigmasterol mit Doppelbindung im Vergleich zu Stigmastanol ohne Doppelbindung.....	5
Abbildung 4:	Sterol Autoxidationsprodukte. R: H-Cholesterol; CH <sub>3</sub> - Campesterol; C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -Sitosterol (mod. nach Lütjohann, 2004) ....	16
Abbildung 5:	Standardgerade MDA .....	28
Abbildung 6:	Eisenstandardgerade .....	39
Abbildung 7:	Vergleich der Hämoglobinwerte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs .....	43
Abbildung 8:	Hämoglobinwerte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs .....	45
Abbildung 9:	Hämoglobinwerte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs .....	46
Abbildung 10:	Vergleich der MDA-Werte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs.....	48
Abbildung 11:	MDA-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs .....	50
Abbildung 12:	MDA-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs .....	51
Abbildung 13:	Vergleich der TAC-Werte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs .....	53
Abbildung 14:	TAC-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs .....	54
Abbildung 15:	TAC-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs .....	55



Abbildung 16:	Vergleich der FRAP-Werte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs .....	56
Abbildung 17:	FRAP-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs.....	57
Abbildung 18:	FRAP-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs.....	58

### **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1:	Phytosterolgehalt ( $\mu\text{g/g}$ Öl) von einigen raffinierten Speiseölen (mod. nach Piironen und Lampi, 2004) .....	7
Tabelle 2:	Auflistung einiger Studien mit Phytosterolen und deren signifikante Auswirkungen auf den Gesamt- und den LDL- Cholesterol (mod. nach Kiefer, 2002) .....	12
Tabelle 3:	Probenverdünnung der Phytosterol-Oxidationsprodukte .....	20
Tabelle 4:	Herstellungsschema für die Proben zur Analyse .....	22
Tabelle 5:	Schema zur Herstellung der MDA-Standardlösungen .....	27
Tabelle 6:	Herstellung der Arbeitsstandards bei der TAC-Bestimmung ....	31
Tabelle 7:	Pipettierschema zur Bestimmung der totalen antioxidativen Kapazität.....	32
Tabelle 8:	Reagenzienherstellung der FRAP-Bestimmung .....	34
Tabelle 9:	Herstellung der Standards für die FRAP-Bestimmung .....	35
Tabelle 10:	Schema zur Herstellung der Verdünnungsreihe der FRAP- Bestimmung .....	35
Tabelle 11:	Grundeinstellungen an der FLUOstar Optima Software .....	36
Tabelle 12:	Mengenangaben, die in die Platten gefüllt werden für die FRAP- Analyse .....	37
Tabelle 13:	Platte 1 und 2, mit der Verteilung der Proben auf der Mikrotiterplatte .....	38

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCGS	ATP-bindendes Transportprotein (ATP-binding Cassette)
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
C	Kohlenstoff
COPs	Cholesterodoxidationsprodukte
bidest.	bidestilliert
EM	Emissionswellenlänge
Emu	Emulgator
Ex	Excitationswellenlänge
FeSO <sub>4</sub>	Eisensulfat
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power Assay
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometer
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	high density Lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumcyanid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LDL	low density Lipoprotein
Lsg	Lösung
LW	Leerwert
M	Molar
MDA	Malondialdehyd
MetMb	Metmyoglobin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

N	Normal
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
POPs	Phytosteroloxidationsprodukte
SOPs	Sterinoxidationsprodukte
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STSM	short-time scientific mission
TAC	Totale antioxidative Kapazität
TBA	Thiobarbitursäure
TEP	Tetraethoxypropan
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
U/min	Umdrehungen pro Minute

### **1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG**

Schon sehr lange ist bekannt, dass ein hoher Cholesterolspiegel einer der stärksten Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen ist. 1912 entdeckten zwei russische Physiologen, dass das Zufüttern von Cholesterol bei Hasen eine Geschwulst verursachte (Soupas, 2006). Ungefähr 40 Jahre später wurde entdeckt, dass Phytosterole den Cholesterolspiegel von sowohl Tieren (Peterson, 1951) als auch Menschen (Pollak, 1953) senken können. Seit dieser Erkenntnis werden Phytosterole zur Behandlung von Hypercholesterolämie eingesetzt. Das erste handelsübliche Produkt war Cytellin (von dem pharmazeutischen Unternehmen Eli-Lilly Co., Indianapolis, IN, USA), welches von 1950 bis 1982 am Markt war (Trautwein E. A. et al., 2003). Heutzutage werden vor allem fetthaltigen Lebensmitteln (hauptsächlich Margarine) Phytosterole zugesetzt. Die wichtigsten natürlichen Quellen von Phytosterolen sind Pflanzensamen und Öle (Elmadfa & Leitzmann, 2004).

Ein sehr wichtiger Gesichtspunkt, der bei mit Phytosterolen und Phytostanolen angereicherten Lebensmitteln (Funktionelle Lebensmittel - Functional Food) betrachtet werden sollte, ist die oxidative Stabilität der Fettkomponenten, d. h. ihre Beständigkeit gegenüber Oxidation und der Entstehung von Oxidationsprodukten. Phytosterole sind fettlösliche Substanzen, die wie Cholesterol oxidieren können. Dadurch entstehen so genannte Phytosteroloxidationsprodukte (POPs) (Guardiola, 2004).

Seit diskutiert wird, ob Phytosteroloxidationsprodukte (POPs) einen negativen Effekt auf die Gesundheit des Menschen haben können, werden der Gehalt in angereicherten Lebensmitteln und der Einfluss des Herstellungsprozesses und der Lagerung erforscht (Lambelet et al., 2003). In Anbetracht dessen, dass die Aufnahme von Phytosterolen in angereicherten Lebensmitteln 8-12 mal höher

ist, als die tägliche natürliche Aufnahme (SCF, 2000), sollten Studien aber nicht nur den Gehalt an Phytosterolen, sondern auch die mögliche Aufnahme von Phytosteroloxidaionsprodukten und deren Wirkung im menschlichen Organismus berücksichtigen. Aktuell gibt es vor allem Bestimmungen von POPs in pflanzlichen Ölen und Bratkartoffelprodukten (fried potato products) (Soupas, 2006). Hauptgründe warum es so wenige Studien über Phytosteroloxidaionsprodukte gibt, sind das Fehlen einer Standardisierung der Phytosteroloxidaionen und limitierte Methoden zur Bestimmung der Oxide in Lebensmitteln.

Ziel dieser Studie war es festzustellen, ob Phytosteroloxidaionsprodukte einen Effekt auf oxidative Parameter des Humanblutes haben. Nach derzeitigem Stand gibt es sehr wenige Studien zu diesem Thema, die in vivo oder in vitro durchgeführt wurden.

## **2. LITERATURÜBERBLICK**

### **2.1 Geschichtlicher Hintergrund**

Bereits im Jahr 1897 wurde ein pflanzliches Phytosterol mit dem Namen Sitosterol aus Weizenkeimöl von Richard Burian isoliert (Burian, 1897). Einige Jahre später entdeckte Rudolph John Anderson, dass dieses Sitosterol aus mehreren Komponenten besteht ( $\alpha$ -Sitosterol,  $\beta$ -Sitosterol,  $\gamma$ -Sitosterol sowie Stigmasterol und Sitostanol). Anderson gelang es im Jahr 1926 aus Weizenkeimöl und Maiskeimöl reines  $\beta$ -Sitosterol zu isolieren (Anderson, 1926a; Anderson, 1926b). Etwas später wurde festgestellt, dass auch  $\alpha$ -Sitosterol ein Gemisch aus mehreren Komponenten ist (Wallis & Fernholz, 1936).

Durch das wachsende Interesse an pflanzlichen Sterolen wurde auf diesem Gebiet immer mehr Forschung betrieben. Nach derzeitigem Kenntnisstand gibt es bis zu 250 verschiedene Arten von Sterolen (Piironen et al., 2000), darunter sind bereits mehr als 40 Phytosterole bekannt (Kiefer et al., 2002). 1931 zeigte eine Studie, dass Phytosterole von Ratten nicht absorbiert werden können (Schoenheimer, 1931). Das Interesse an Stanolen (hydrierte Form der jeweiligen Phytosterole) stieg, als eine Studie an Ratten zeigte, dass die unveresterte Form Sitosterol eine geringere absorptionshemmende Wirkung hat als das veresterte Sitostanol (Ikeda & Sugano, 1978).

Peterson informierte im Jahr 1951 über die cholesterolsenkende Wirkung von Phytosterolen bei Hühnern (Peterson, 1951). Bereits im Jahr 1953 fand die erste Humanstudie dazu statt. 5-7 g Sitosterol wurden 26 hypercholesterolämischen Männern verabreicht. Der Cholesterolspiegel sank um 28%

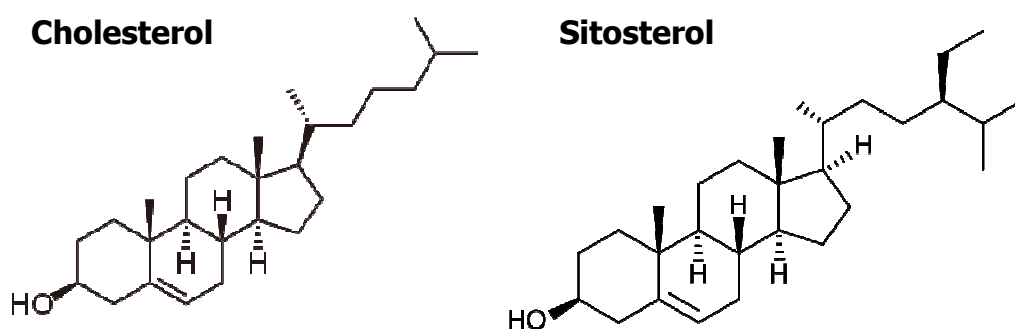
(Pollak, 1953). 1977 zeigte sich in einer Humanstudie, dass es bei einer geringeren Aufnahme von Phytosterolen (3-6 g/Tag) zum gleichen Effekt kommt wie bei einer Aufnahme von 18 g (Lees et al., 1977).

Der Begriff Phytosterol wird in vielen Literaturangaben als Oberbegriff für ungesättigte Sterole und gesättigte Stanole verwendet (Law, 2000). Der Nahrungsphytosterolgehalt von etwa 360 mg in der normalen Nahrung reicht nicht aus, um eine effektive Senkung des Cholesterolspiegels zu erreichen. Erst durch eine tägliche Zufuhr von mindestens 1 g wird dies erzielt (Kiefer et al., 2002).

## 2.2 Phytosterole

### 2.2.1 Struktur und natürliches Vorkommen von Phytosterolen

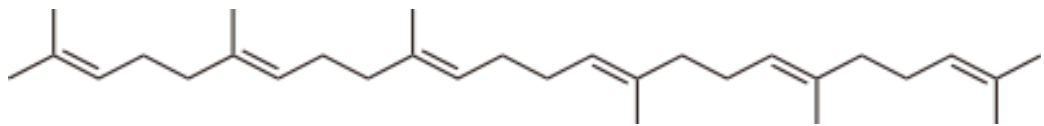
Die in der Natur vorkommenden pflanzlichen Sterole (Phytosterole) unterscheiden sich vom tierischem Cholesterol lediglich in der Konstitution und Länge der Seitenkette (Elmadfa & Leitzmann, 2004). Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur von Cholesterol und einem Phytosterol.



**Abbildung 1:** Cholesterolstrukturformel im Vergleich zu einem Phytosterol

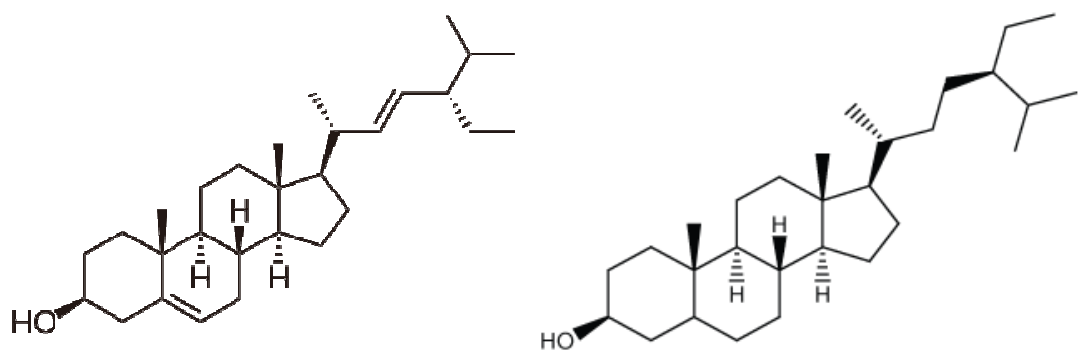


Genauso wie Carotinoide, Saponine und Glucosinolate gehören Phytosterole zu den sekundären Pflanzenstoffen (Watzl & Leitzmann, 1999). Gebildet werden Phytosterole aus so genannten Squalen (Abbildung 2) und gehören somit zur Gruppe der Triterpene. Sie sind aus einem tetracyclischen Cyclopenta- $\alpha$ -Phenanthrenring und einer flexiblen Seitenkette am C-17-Atom aufgebaut (Piironen et al., 2000).



**Abbildung 2: Squalen Strukturformel**

Die meisten Phytosterole, genauso wie Cholesterol, besitzen eine Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 im tetracyclischen Ringsystem. Gesättigte Phytosterole, die keine Doppelbindung besitzen (Abbildung 3), werden als Phytostanole bezeichnet (z. B. Stigmastanol).



**Abbildung 3: Stigmasterol mit Doppelbindung im Vergleich zu Stigmastanol ohne Doppelbindung**

Phytosterole haben in der pflanzlichen Zelle viele wichtige Funktionen. Sie regulieren die Fließeigenschaften und die Durchlässigkeit der Zellwände und können auch die Entwicklung und das Wachstum von Pflanzen fördern, z. B. Brassinosteroide (Phytohormone) (Soupas, 2006). Die häufigsten Vertreter der pflanzlichen Sterole sind  $\beta$ -Sitosterole welche 45-95% ausmachen. Campesterole machen weitere 30% und Stigmasterole bis zu 25% des Gesamtgehaltes an Sterolen in Ölsamen aus (Weihrauch & Gardner, 1978).

Körpereigenes Cholesterol bei Tieren kommt vor allem in freier Form (als Alkohol) und zu einem kleinen Teil als langkettige Fettsäureester vor. Phytosterole hingegen sind in einer großen Vielfalt von Derivaten in Pflanzen enthalten (Soupas, 2006). Zu ihnen gehören  $\beta$ -Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol, die frei, verestert oder an ein Glycosid gebunden, vorkommen (Jones et al., 2000).

Tiere und Menschen synthetisieren keine Phytosterole, nur Cholesterol. Die Aufnahme erfolgt mit Hilfe von pflanzlicher Nahrung (Soupas, 2006). Die tägliche Aufnahme von Phytosterolen liegt zwischen 160 und 360 mg/Tag. Bei Vegetariern ist die Aufnahme höher (Law, 2000). Phytosterole kommen hauptsächlich in Pflanzenölen und -samen vor und gehören zu den nichtverseifbaren Komponenten. In Pflanzenölen beträgt der Gehalt an Phytosterolen etwa 0,2-1,0%, in Keimölen bis zu 2,6%, dabei lässt sich in abnehmender Reihenfolge eine bestimmte Konzentrationsverteilung der einzelnen Sterole beobachten (Sitosterol > Campesterol > Stigmasterol) (Elmadfa & Leitzmann, 2004).

Vor allem pflanzliche Öle werden als natürliche Hauptquelle für Phytosterole angesehen, gefolgt von Getreidekörnern und Nüssen. Unter den pflanzlichen Ölen besitzen Maiskeimöl und Rapsöl den höchsten Gehalt an Phytosterolen (Piironen et al., 2000). In Tabelle 1 sind einige pflanzliche Öle mit deren Hauptphytosterolen aufgelistet. Einige Spezialöle, wie Reiskleienöl und

Weizenkeimöl, können einen Gehalt an Phytosterolen von bis zu 32 mg/g Öl aufweisen (Piironen et al., 2000). Der Phytosterolgehalt liegt bei frischem Gemüse zwischen 5-40 mg/100 g Lebensmittel. Die höchsten gemessenen Konzentrationen befinden sich in Broccoli, Kohlsprossen und Dille. In frischen Früchten liegt der Gehalt an Phytosterolen zwischen 10-20 mg/100 mg Früchten.

Öle	Sitosterol	Campesterol	Stigmasterol
Palmöl	350-410	140-180	70-100
Olivenöl	1220-1300	20-50	0-30
Rapsöl	3580-3950	1640-3000	0-160
Sonnenblumenöl	1940-2570	270-550	180-320
Maiskeimöl	4540-5430	1230-1640	460-590

**Tabelle 1: Phytosterolgehalt ( $\mu\text{g/g}$  Öl) von einigen raffinierten Speiseölen (mod. nach Piironen und Lampi, 2004)**

In Pflanzen, die fettarm sind, ist der Gehalt an Phytosterolen eher gering. Die Menge an Sitosterol, bezogen auf die Gesamtmenge an Phytosterolen, ist in den meisten Gemüsesorten (43-86%), Früchten (72-86%) und Beeren (61-93%) am höchsten (Piironen et al., 2003).

### 2.2.2 Stoffwechsel

Im Gegensatz zu Cholesterol kann der menschliche Organismus Phytosterole nicht synthetisieren. Daher können sie nur exogen zugeführt werden. Von diesen aufgenommenen Phytosterolen werden nur durchschnittlich 5% absorbiert. Dabei liegt die Absorptionsrate von  $\beta$ -Sitosterol bei 4,2%, von Stigmasterol bei 4,8% und von Campesterol bei 9,6% (Elmadfa & Leitzmann, 2004). Der restliche Anteil bleibt im Darmtrakt und wird mit den Fäzes

ausgeschieden. Die Ausscheidung der resorbierten Phytosterole erfolgt über die Galle genauso wie die Cholesterolausscheidung (Watzl & Leitzmann, 1999).

Eine amerikanische Studie wies eine noch geringere Absorption auf, nämlich für  $\beta$ -Sitosterol 0,5% und für Campesterol 1,9% (Ostlund, 2002). Die Absorptionsrate von Cholesterol liegt zwischen 30 und 80% (Bosner et al., 1999) und die Werte für Phytosterole zwischen 1% und maximal 15% (Sanders et al., 2000). Warum es so unterschiedliche Absorptionen der einzelnen Phytosterole gibt, ist noch nicht genau geklärt. Laut Ostlund wird die Absorptionsrate durch die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 erhöht und durch die Länge der Seitenkette am C-24 reduziert (Ostlund, 2002).

Trotz gleicher Aufnahme an Phytosterol und Cholesterol, werden Phytosterole im Intestinaltrakt zu einem geringeren Anteil absorbiert (sie haben eine deutlich kürzere Verweildauer). Die insgesamt niedrigere Absorption von Phytosterolen und Stanolen hängt mit der geringeren Veresterungsrate in den Enterozyten, die den Einschluss in die Chylomikronen limitieren, zusammen. Weiters spielen ABCG5 und ABCG8 (ATP-bindendes Transportprotein) eine wichtige Rolle beim Transport der Sterole. Die aufgenommenen Phytosterole und Stanole gelangen mittels Mizellentransport zu den Enterozyten. Hier dürfte ein Großteil der Phytosterole und Stanole mit Hilfe des ABCG5+8 Komplexes wieder zurück in den intestinalen Lumen transportiert werden. Dieser Vorgang ist für die geringe Absorption von Phytosterolen und Stanolen verantwortlich (Igel et al., 2003; Soupas, 2006).

Es gibt eine sehr seltene, rezessiv vererbte Störung der Phytosterolaufnahme, die so genannte Phytosterolämie. Dabei werden zwischen 15 und 60% der Nahrungsphytosterole absorbiert (Kiefer et al., 2002). Durch die Speicherung kommt es zu einer erhöhten Prädisposition (Empfänglichkeit) für die Entwicklung einer frühzeitigen Atherosklerose sowie zur Bildung von Xanthomen (orange-gelbliche knotenartige Fettablagerungen an der Haut). Das

geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gallensäureproduktion Cholesterol-7- $\alpha$ -Hydroxylase wird durch die hohe Phytosterolkonzentration in der Leber kompetitiv gehemmt und dadurch ist der Haupteliminationsweg der Sterole gestört (Elmadfa & Leitzmann, 2004).

### **2.2.3 Funktionelle Lebensmittel**

Die Ernährungstherapie spielt neben der medikamentösen Behandlung bei Fettstoffwechselstörungen eine große Rolle. Funktionelle Lebensmittel können diätetische Maßnahmen unterstützen (Kiefer et al., 2002). Zu unterscheiden ist zwischen angereicherten und funktionellen Lebensmitteln. Mit ersteren wird versucht, Mangelzustände z. B. Vitamin A, Eisen, Jod usw. zu beheben oder diesen vorzubeugen. Funktionelle Lebensmittel sollen vor ernährungsabhängigen Krankheiten schützen und bestimmte Körperfunktionen verbessern (Elmadfa, 2004).

Seit Herbst 2008 ist das Joghurtgetränk DANACOL (Danone) am Markt. Von der Firma Unilever gibt es gleich drei Produkte: Trinkjoghurt, Trinkmilch und eine Halbfettmargarine. Alle diese Produkte enthalten zugesetzte Phytosterole, so genannte sekundäre Pflanzenstoffe (Gebhard, 2008). Phytosterole im Darm können das während der Fettverdauung in Micellen gespeicherte Cholesterol verdrängen. Dadurch wird die Cholesterolaufnahme verringert (Watzl & Leitzmann, 1999). Auch die Bildung von schädlichen sekundären Stoffwechselprodukten im Darm, wie z. B. Abbauprodukte von Cholesterol oder sekundäre Gallensäuren, wird indirekt verhindert (Elmadfa & Leitzmann, 2004).

In einer holländischen Studie Namens „Doetinchem cohort study“ wurden 4505 Personen im Alter von 26-70 Jahren auf die Cholesterolsenkende Wirkung von Phytosterolen überprüft.

Die Teilnehmer wurden in vier Gruppen unterteilt:

1. Gruppe: Verzehr von Phytosterol/-stanol-angereicherter Margarine (n= 72)
2. Gruppe: Einnahme von cholesterolsenkenden Medikamenten (n= 218)
3. Gruppe: Eine Kombination von Gruppe 1 und 2 (n= 12)
4. Gruppe: Kontrollgruppe (n= 4205)

Nach Ablauf von fünf Jahren wurde der Gesamtcholesterolspiegel im Blut gemessen und mit den Anfangswerten verglichen. Der Gesamtcholesterolspiegel bei Gruppe 1 (Verzehr von Phytosterol/-stanol-angereicherter Margarine) zeigte eine durchschnittliche Abnahme, die jedoch nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu lag bei der Gruppe 4 eine signifikante Erhöhung des Gesamtcholesterolspiegels im Blut vor. Wohingegen sich bei Gruppe 2 und 3 ein signifikanter Abfall des Blutcholesterolspiegel zeigte. In allen 4 Gruppen kam es zu keiner signifikanten Veränderung des HDL-Cholesterolspiegels. Anhand dieser Studie kann der Einfluss von phytosterol-angereicherter Margarine mit der Stabilisierung des Cholesterolspiegels charakterisiert werden (Wolfs et al., 2006).

Weitere Studien, die sich mit der cholesterolsenkenden Wirkung von Phytosterolen beschäftigten, werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

### **2.2.4 Einfluss von Phytosterolen auf den Cholesterol- und Carotinoidspiegel**

Anhand einiger Studien (Tabelle 2) lässt sich ein positiver Einfluss von Phytosterolen auf einen hohen Cholesterolspiegel erkennen. Die Senkung bezieht sich auf den Gesamt- und den LDL-Cholesterolspiegel und betrifft nicht das HDL-Cholesterol (Blair et al., 2000; Hallikainen et al., 2000; Hendriks et al., 1999; Jones et al., 2000). Für eine wirksame Senkung des Cholesterolspiegels reicht eine Phytosterolmenge von etwa 360 mg, die mit der Nahrung

aufgenommen wird, nicht aus. Erst ab einer Aufnahme von mindestens 1 g werden positive Effekte gezeigt (Hendriks et al., 1999).

In einer vierwöchigen Studie, die einen täglichen Verzehr einer phytosterol-angereicherten Margarine testete, wurde eine signifikante Senkung des Gesamtcholesterols um 8,4% ( $p < 0,001$ ) und des LDL-Cholesterols um 11% ( $p < 0,01$ ) festgestellt (Fasching et al., 2001). Auch die Studie von Hallikainen mit 34 hypercholesterolämischen Probanden zeigte eine signifikante Reduktion von Gesamt- und LDL-Cholesterol durch den Verzehr von Stanolen und Sterolen in Zusammenhang mit einer fettarmen Diät. Innerhalb von vier Wochen wurden täglich 2,01–2,04 g Stanolester bzw. Sterolester aufgenommen (Hallikainen et al., 2000).

Studie	Probanden	Dauer	Typ	Tagesdosis in g	Senkung des Serum- gesamt- Cholesterols in %	Senkung des Serum- LDL in %
Hendriks et al., 1999	80	3,5 Wo	Sterol	0,83-3,24	4,9-6,8 <sup>a</sup>	6,7-9,9 <sup>a</sup>
Hallikainen et al., 2000 <sup>2</sup>	34	4 Wo	Sterol	2,01-2,04	7,3 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>
Hallikainen et al., 2000 <sup>2</sup>	34	4 Wo	Stanol	2,01-2,04	9,2 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>
Jones et al., 2000 <sup>2</sup>	15	21 d	Sterol	1,84	13,4 <sup>a</sup>	12,9 <sup>a</sup>
Jones et al., 2000 <sup>2</sup>	15	21 d	Stanol	1,84	10,2 <sup>a</sup>	7,9 <sup>a</sup>
Blair et al., 2000 <sup>1</sup>	167	8 Wo	Stanol	5,1	12 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>
Fasching et al., 2001	15	4 Wo	Sterol	1,6	8,4 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Probanden unter Statintherapie

<sup>2</sup> Probanden mit Hypercholesterolämie

<sup>a</sup> signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Intervention mit Margarine)

<sup>b</sup> signifikante Änderung im Vergleich zum Ausgangswert

**Tabelle 2: Auflistung einiger Studien mit Phytosterolen und deren signifikante Auswirkungen auf den Gesamt- und den LDL-Cholesterol (mod. nach Kiefer, 2002)**

Anhand einer klinischen Studie von Blair, wurde durch Supplementation von Phytosterolen eine Senkung des Cholesterol- und LDL-Spiegels festgestellt. Das Kollektiv umfasste 67 Frauen und 100 Männer, die einen LDL-Cholesterolspiegel von  $\geq 130$  mg/dl und Gesamtcholesterol von  $\geq 350$  mg/dl aufwiesen und mit Statinen behandelt wurden. Bei einer Gabe von 5,1 g/Tag an Stanolen für 8 Wochen sank das Gesamtcholesterol signifikant im Blut um 12% bei den Placebo-Probanden um 5%. Der LDL-Cholesterolwert sank signifikant bei der



Gabe von Phytosterolen um 17% und bei der Placebo-Gruppe um 7% (Blair et al., 2000).

In den in Tabelle 2 aufgelisteten Studien wurde gezeigt, dass Phytosterol- und Phytostanolester eine signifikant cholesterolsenkende Wirkung haben. Jedoch gibt es wenige Studien, die klären, ob der zuständige Mechanismus dazu auch der selbe ist. Diese Frage hat sich eine klinische Studie von Jones gestellt, in der der Cholesterolgehalt im Plasma, die Absorptionsrate und die Neusynthese von Cholesterol im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht wurde. Dabei erhielten 15 Männer mit Hypercholesterolämie, im Alter von 37 bis 61 Jahren, für 21 Tage entweder eine Kontrollmargarine (Gruppe 1), eine Margarine mit Phytosterolen (Gruppe 2) oder eine mit Phytostanolen angereicherte Margarine (Gruppe 3). Der Gesamtcholesterolspiegel im Plasma war am Ende der Studie bei Gruppe 2 signifikant niedriger und bei Gruppe 3 niedriger im Vergleich zur Kontrollmargarine. Das LDL-Cholesterol im Plasma war sowohl bei Gruppe 2 als auch bei Gruppe 3 signifikant niedriger im Gegensatz zu den Werten von Gruppe 1. Bei dem Triglyceridspiegel und HDL-Cholesterol kam es zu keinen Unterschieden zwischen den Gruppen. Die Cholesterolaufnahme wurde bei Gruppe 2 und 3 im Vergleich zur Gruppe 1 signifikant ( $p < 0,05$ ) reduziert, wohingegen die Biosynthese von Cholesterol signifikant erhöht wurde. Zusammenfassend kann man festhalten, dass pflanzliche Sterole und Stanole durch die Unterdrückung der Cholesterolabsorption den LDL- und Gesamtcholesterolspiegel senken (Jones et al., 2000).

Neben der cholesterolsenkenden Wirkung kann die Aufnahme von pflanzlichen Sterolen und Stanolen auch die Konzentration von sauerstofffreien Carotinoiden reduzieren. Einige Studien zeigten, dass es bei einer Zufuhr von Phytosterolen auch zu einer Senkung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotinkonzentrationen im Plasma kommen kann (Watzl & Leitzmann, 1999).

Eine Metaanalyse, die 18 Studien zusammenfasst in denen 1,5 g/Tag oder mehr pflanzliche Sterole und Stanole aufgenommen wurden, zeigte folgendes Ergebnis: Es trat eine signifikante Reduktion der Konzentration an sauerstofffreien Carotinoiden im Plasma auf,  $\alpha$ -Carotin um 9%,  $\beta$ -Carotin um 28% und Lycopin um 7%. Da LDL wichtig für den Carotinoidtransport ist, musste die LDL-Cholesterol-Abnahme nach der Aufnahme von pflanzlichen Sterolen und Stanolen berücksichtigt werden. Nach der Korrektur kam es ausschließlich bei der  $\beta$ -Carotinkonzentration im Plasma zu einer statistisch signifikanten Reduktion. Die Vitamin D- und Vitamin A-Konzentrationen blieben unbeeinflusst von Sterolen und Stanolen (Katan et al., 2003).

Eine Studie von Hendriks zeigte bei der Einnahme von pflanzlichen Sterolen eine verminderte Konzentration an ( $\alpha$ - $\beta$ )-Carotin. Die Carotinkonzentration war vermindert mit 12% bei 0,83 g, 11% bei 1,61 g und 19% bei einer Einnahme von 3,24 g/Tag für 3,5 Wochen. Die Aufnahme von 1,6 g Phytosterolen beeinflusste den Cholesterolspiegel positiv, jedoch ohne signifikanten Einfluss auf den  $\beta$ -Carotinspiegel (Hendriks et al., 1999).

## **2.3 Oxidationsprodukte von Phytosterolen**

### **2.3.1 Allgemein**

Zu den oben erwähnten positiven Eigenschaften wurde auch die oxidative Stabilität von Sterolen untersucht. Viele Studien haben die Cholesteroolxidation und ihre zytotoxischen Wirkungen intensiv behandelt (Guardiola et al., 2002; Schroepfer, 2000). Da Phytosterole genauso wie Cholesterol fettlösliche Substanzen sind, können durch Oxidation Steroolxidationsprodukte (SOPs) entstehen. Der Begriff SOPs beinhaltet sowohl die Cholesteroolxidations-

produkte (COPs) als auch die Phytosteroloxidaionsprodukte (POPs) (Guardiola, 2004).

COPs wurden in der Vergangenheit intensiver behandelt als POPs. In den späten 60er Jahren wurden die biologischen Einflüsse von COPs, vor allem die schädigende Wirkung in Verbindung mit einigen chronischen und degenerativen Erkrankungen, erforscht. Am häufigsten wurden COPs in frischen Lebensmitteln und verarbeiteten Produkten untersucht (Guardiola, 2004).

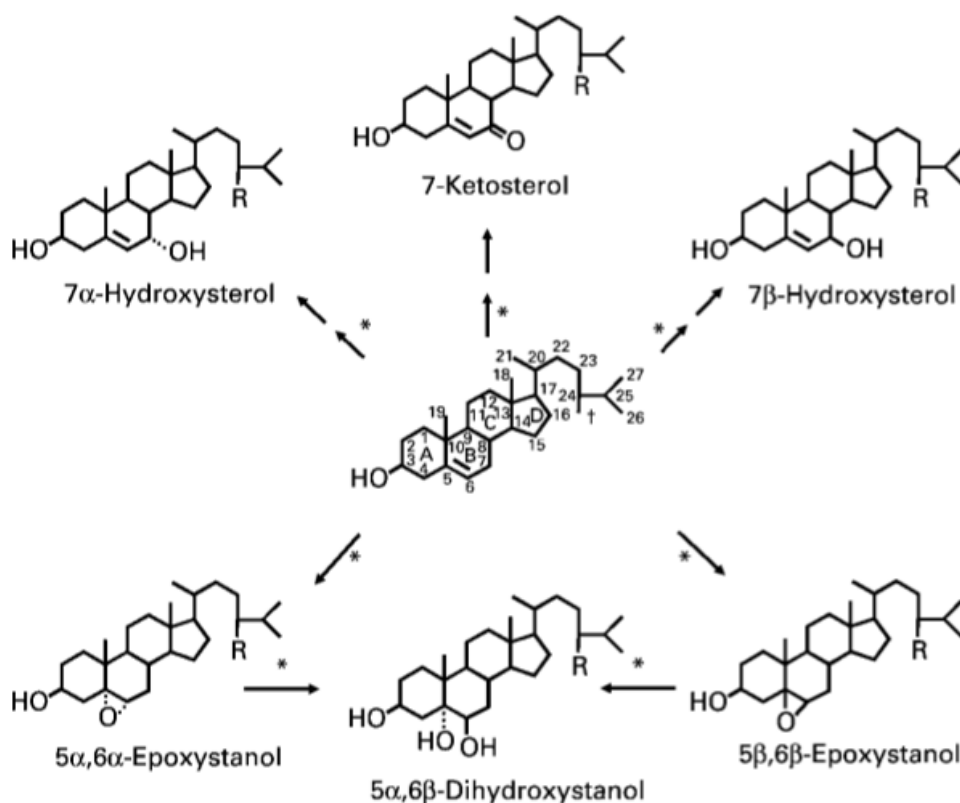
### **2.3.2 Oxidation**

Durch enzymatische und nicht enzymatische Oxidation von Cholesterol können COPs entstehen (Guardiola, 2004). Basierend auf den Ergebnissen der Studie von Apprich und Ulberth, kann man davon ausgehen, dass COPs und POPs in ihrer Reaktion sehr ähnlich sind (Apprich & Ulberth, 2004). POPs können durch physikalische, nicht enzymatische und enzymatische Prozesse entstehen. Zu den physikalischen zählen Erwärmung und Bestrahlung, nicht enzymatisch beinhaltet reaktiven Sauerstoff und freie Radikale. An den enzymatischen Prozessen ist vor allem das Cytochrom P450 beteiligt. Am anfälligsten gegenüber Oxidationen ist der B-Ring (Lutjohann, 2004).

Eine der ersten gezielten Studien über Phytosteroloxidaionsprodukte wurde 1980 durchgeführt (Yanishlieva & Marinova, 1980). Diese Forschung war nicht so gezielt und ausführlich wie bei Cholesterol, jedoch belegten alle Informationen, dass Phytosterole in derselben Weise wie Cholesterol oxidiert werden. Dies ist auf die Ähnlichkeit der Struktur zurückzuführen wie sie im Kapitel 2.2.1 dargestellt wurden (Soupas, 2006).

### 2.3.3 Struktur und Gehalt von POPs in Lebensmitteln

Allgemein kann gesagt werden, dass alle sterolhaltigen Lebensmittel die oxidativ-fördernden Faktoren wie z.B. Licht, Hitze, Wasser und Metallionen ausgesetzt sind, einer Oxidation mit anschließender Radikalbildung unterliegen. Genau diese Faktoren treten bei der Lebensmittelproduktion und -lagerung auf (Soupas, 2006). Die Produkte, die bei einer Autoxidation von Cholesterol und Phytosterol entstehen, sind in Abbildung 4 dargestellt (Lütjohann, 2004). Durch die unterschiedliche Zusammensetzung von Lebensmitteln und das Auftreten von Steroloxidationen werden Lebensmittel-Studien kritisch betrachtet (Soupas, 2006).



**Abbildung 4: Sterol Autoxidationsprodukte. R: H-Cholesterol; CH<sub>3</sub>-Campesterol; C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-Sitosterol (mod. nach Lütjohann, 2004)**

Einige Studien beschäftigten sich mit POPs in folgenden Lebensmitteln: Pommes Frites, Kartoffelchips, pflanzlichen Ölen, Weizenmehl, Kaffee und handelsüblicher Margarine. Einige wiesen darauf hin, dass POPs die intestinalen Barrieren passieren können, allerdings nur in unwesentlicher Höhe (Ryan et al., 2005).

Conchillo untersuchte den Gehalt von POPs in nicht angereicherten (0,33 g Phytosterol/100 g) und angereicherten (6,07 g Phytosterol/100 g) Aufstrichen. Der angereicherte Aufstrich enthielt 45,6 mg/kg und der nicht angereicherte 13,31 mg/kg POPs. Berechnet man daraus die Oxidationsrate der beiden Produkte, ist die Rate beim angereicherten Aufstrich geringer (0,07%) als beim Aufstrich, der nicht angereichert wurde (0,41%) (Conchillo et al., 2005).

### **2.3.4 Biologische Effekte von POPs und COPs**

Viele Forschungen haben sich intensiv mit den biologischen Effekten von COPs beschäftigt. Diese belegten, dass es eine Verbindung zwischen einer Serie von Erkrankungen, z. B. schädliche Effekte von Fettstoffwechsel und Zellfunktionen, und den COPs gibt (Osada, 2002). Hunderte in vitro Studien belegten einen aktiven Einfluss von COPs auf die Entwicklung von Atherosklerose (Soupas, 2006). COPs können auch zellschädigend, erbgutverändernd und krebserregend wirken (Osada, 2002). Diese Aussagen sind bezogen auf in vitro Experimente mit reinen Steroloxiden. Was nicht vergleichbar ist mit der in vivo Situation, wo Steroloxide generell nur in sehr geringen Mengen und in Gegenwart von überschüssigem Cholesterol vorhanden sind (Lea et al., 2004).

Eine Studie von Ryan, aus Irland, versuchte qualitativ und quantitativ die zytotoxischen und apoptotischen Einflüsse von POPs im Vergleich zu deren korrespondierenden COPs zu erforschen. Untersucht wurde die Wirkung von

$\beta$ -Sitosteroloxiden und den dazugehörigen COPs. Dafür wurden drei verschiedene menschliche Zelllinien herangezogen, eine Monozyten-Zelllinie (U937), eine Darmkrebs-Zelllinie (CaCo-2) und eine Leberkrebs-Zelllinie (HepG2). Mit einer geringen Konzentration von 30  $\mu$ M zeigten POPs keinen negativen Einfluss auf die Lebensdauer der Zellen. Im Vergleich dazu zeigten bei dieser Konzentration  $\beta$ -Epoxycholesterol, 7- $\beta$ -Hydroxycholesterol, 7-Ketcholesterol und Triolcholesterol eine signifikante Reduktion der Überlebensfähigkeit der Zellen. Bei einer Konzentration von 60  $\mu$ M zeigte ausschließlich 7- $\beta$ -Hydroxysitosterol einen signifikanten Effekt. Erst ab einer Konzentration von 120  $\mu$ M zeigten sowohl 7- $\beta$ -Hydroxysitosterol, 7-Ketositosterol,  $\beta$ -Epoxysitosterol als auch Triolsitosterol einen signifikanten Einfluss auf die Lebensdauer der Zellen. Das  $\alpha$ -Epoxysitosterol war in der Zelllinie U937 mit keiner der getesteten Konzentrationen toxisch. Eines der  $\beta$ -Sitosterole, nämlich 7- $\beta$ -Hydroxysitosterol, bewirkte als einzige eine Senkung von Glutathion. Was darauf rückschließen lässt, dass eine Apoptose, induziert von POPs, nicht nur von oxidativem Stress abhängig sein muss. Es zeigte sich, dass POPs eine ähnliche toxische Wirkung wie COPs haben, jedoch ist für denselben Effekt eine höhere Konzentration von POPs erforderlich (Ryan et al., 2005).

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Studiendesign**

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Phytosteroloxidationsprodukten (POPs) auf antioxidative Parameter im Vollblut (in vitro) zu testen. Dabei wurden verschiedene POPs mit unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

#### **3.2 Herkunft der Proben**

Die Proben wurden von meiner Kollegin Karin Koschutnig über ein Projekt der Cost Action 927 (europäische Forschungsgemeinschaft) in Zusammenarbeit mit dem Department für angewandte Chemie und Mikrobiologie in Helsinki/Finnland unter der Leitung von Prof. Dr. Vieno Piironen im Rahmen einer STSM (short-time scientific mission) hergestellt.

#### **3.3 Verwendete Proben**

Zur Verfügung standen die Oxidationsprodukte 7-Ketositosterol, 7- $\beta$ -OH-Sitosterol, 7- $\alpha$ -Sitosterol und eine Mischung (Mixtur), aus allen hier genannten Oxidationsprodukten. Bis auf 7- $\alpha$ -Sitosterol, welches sich relativ schwer löste, wurden alle hier aufgezählten POPs in dieser Arbeit berücksichtigt.

## 3.4 Herstellung der Test-Lösung

Das Ethanol der Ausgangsproben wurde mit Hilfe von Stickstoff abgedampft. Durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen an Emulgator Solutol HS 15 (25 g Emulgator erhitzen bis er flüssig ist und auf 100 ml mit Wasser bidestilliert (bidest.) auffüllen) wurden verschiedene Verdünnungen (Tabelle 3) hergestellt. Auf Grund der sinkenden Löslichkeit bei abnehmender Emulgatormenge wurden niedrige Konzentrationen gewählt (15-60  $\mu\text{M}$ ). Bei 7- $\beta$ -OH-Sitosterol löste sich nur die 15  $\mu\text{M}$  Lösung. Um eine höhere Konzentration an POPs im Blut zu erhalten, wurde die Zugabe dementsprechend (Tabelle 4) erhöht. Bis zur Verwendung wurden die Lösungen bei  $-18^\circ\text{C}$  tiefgekühlt.

Probe	Ausgangskonz.	Verdünnung		
7-Ketositosterol	1753,20 mg/500 ml	15 $\mu\text{M}$	3,7 ml abdampfen	8 ml Emu
		30 $\mu\text{M}$	3,7 ml abdampfen	4 ml Emu
		60 $\mu\text{M}$	3,7 ml abdampfen	2 ml Emu
7- $\beta$ -OH-Sitosterol	1044,41 mg/450 ml	15 $\mu\text{M}$	5,6 ml abdampfen	8 ml Emu
Mixtur	1260 mg/500 ml	15 $\mu\text{M}$	5,1 ml abdampfen	8 ml Emu
		30 $\mu\text{M}$	5,1 ml abdampfen	4 ml Emu
		60 $\mu\text{M}$	5,1 ml abdampfen	2 ml Emu

**Tabelle 3: Probenverdünnung der Phytosterol-Oxidationsprodukte**

## 3.5 Probanden

Bei den Probanden handelte es sich um fünf weibliche, nichtrauchende Studentinnen der Ernährungswissenschaften im Alter zwischen 20 und 30 Jahren (Mittelwert  $26,2 \pm 2,5$  Jahre). Den Probanden wurden einmalig 9 Röhrchen à 8 ml Vollblut (venös) entnommen. Die Blutabnahme fand



morgens nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz an unterschiedlichen Werktagen im Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien statt.

### Einschlusskriterien:

- Alter zwischen 20 und 30 Jahren
- Geschlecht weiblich
- Nicht-Raucher
- Keine Medikamenteneinnahme
- Zum Zeitpunkt der Blutabnahme guter Gesundheitszustand

## **3.6 Untersuchungsparameter**

Für die vier verschiedenen Analysen wurde folgender Untersuchungsparameter herangezogen:

- Totale antioxidative Kapazität TAC: Plasma
- Antioxidative Kapazität FRAP: Plasma
- Malondialdehyd MDA: Plasma
- Hämoglobin: Plasma

## **3.7 Probenvorbereitung**

### **3.7.1 Zugabe der Phytosteroloxidaionsprodukte**

Nach der Blutabnahme wurde pro Proband das gesamte Vollblut auf Röhrchen aufgeteilt. Jedes Röhrchen beinhaltete 2 g Blut. Dieser Menge Vollblut wurde eine bestimmte Menge POPs mit einer entsprechenden Konzentration hinzugefügt (Tabelle 4). Danach wurde eine Probenreihe für 30 Minuten und eine weitere für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden immer

doppelt angesetzt. Weiters wurden für die Stichprobe pro Proband und Inkubationszeit zwei Doppelbestimmungen durchgeführt. Blutproben, denen nur Emulgator zugesetzt wurde, dienten als Kontrolle.

<b>2 g Vollblut</b>	<b>Konzentration</b>
ohne Zugabe	-
mit 16 µl Emulgator	-
mit 32 µl Emulgator	-
mit 64 µl Emulgator	-
mit 16 µl von 7-Keto/Emulgator 15 µM Gemisch	30 µM
mit 16 µl von 7-Keto/Emulgator 30 µM Gemisch	60 µM
mit 16 µl von 7-Keto/Emulgator 60 µM Gemisch	120 µM
mit 32 µl von 7-Keto/Emulgator 60 µM Gemisch	240 µM
mit 16 µl von 7-β-OH/Emulgator 15 µM Gemisch	30 µM
mit 32 µl von 7-β-OH/Emulgator 15 µM Gemisch	60 µM
mit 64 µl von 7-β-OH/Emulgator 15 µM Gemisch	120 µM
mit 16 µl von Mixtur/Emulgator 15 µM Gemisch	30 µM
mit 16 µl von Mixtur/Emulgator 30 µM Gemisch	60 µM
mit 16 µl von Mixtur/Emulgator 60 µM Gemisch	120 µM
mit 32 µl von Mixtur/Emulgator 60 µM Gemisch	240 µM

**Tabelle 4: Herstellungsschema für die Proben zur Analyse**

### 3.7.2 Gewinnung von Plasma

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Blutzellen vom Plasma durch Zentrifugieren (Heraeus Megafuge 1.OR) bei 3000 U/min für 10 min bei einer Temperatur von 7°C abgetrennt. Das Plasma wurde in Eppendorfcups pipettiert, mit Stickstoff begast und bei -80°C bis zur Analyse tiefgefroren. Vor jeder Analyse wurden die Plasmaproben nach dem Auftauen für 5 min bei 7°C mit 3000 U/min zentrifugiert (Eppendorfer Centrifuge 5415R für Caps).

### **3.8 Vorversuch mit verschiedenen Lösungsmitteln**

Zunächst wurde in einem Vorversuch getestet, welches Lösungsmittel die unterschiedlichen POPs löst und bei der Zugabe zum Blut keine Hämolyse verursacht. Es wurden Löslichkeitsversuche mit den Emulgatoren Tween 20, Solutol HS 15 und Ethanol durchgeführt. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen von den Phytosteroloxidaionsprodukten hergestellt.

#### **3.8.1 Ergebnisse**

Die Proben lösten sich hervorragend mit Hilfe von Ethanol. Jedoch zeigte die Zugabe des Phytosterol-Ethanol-Gemisches bei der Hämoglobinbestimmung eine hämolytische Wirkung auf die Erythrozytenmembran. Damit wäre eine photometrische Bestimmung, wie bei TAC, nicht möglich. Der Versuch, die POPs mit dem Emulgator Tween 20 zu lösen, lieferte keine brauchbare Löslichkeit. Nach weiteren Versuchen führte die Verwendung des Emulgators Solutol HS 15 zu einem optimalen Ergebnis.

### **3.9 Vorversuch mit einer Probandin**

Im zweiten Vorversuch wurden einer Probandin 8 Röhrchen à 8 ml Vollblut (heparinisiert) abgenommen. Nachdem sich beim ersten Vorversuch eine negative Entwicklung mit Ethanol und Tween 20 zeigte, wurden die Blutproben mit den in Emulgator Solutol HS 15 gelösten POPs versetzt (siehe Herstellung der Test-Lösung).

Wie im Hauptversuch wurden folgende Parameter gemessen:

- Malondialdehyd (MDA)

- Totale antioxidative Kapazität (TAC)
- Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP)
- Hämoglobin

Weiters wurden zwei Inkubationszeiten (30 min & 120 min) festgelegt, um herauszufinden, ob die Einwirkzeit einen Einfluss auf die zu untersuchenden Parameter hat.

### **3.9.1 Ergebnisse**

Die abgenommene Blutmenge von 8 Heparinröhrchen war für die Herstellung der benötigten Probenmenge nicht ausreichend. Die Verwendung des Emulgators Solutol HS 15 zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Messungen der verschiedenen Parameter. Da ein Unterschied zwischen den zwei Inkubationszeiten erkennbar war, wurden die beiden Inkubationszeiten für den Hauptversuch beibehalten.

## **3.10 Hauptversuch**

Der Hauptversuch wurde wie geplant mit 5 Probandinnen durchgeführt. Da die Vollblutmenge aus 8 Heparinröhrchen nicht ausreichend war, wurde die Anzahl der abgenommenen Röhrchen auf 9 (in Summe etwa 72 ml Blut) erhöht.

### **3.10.1 Malondialdehyd MDA**

Mit dieser Methode wird die Lipidperoxidation, die im Probenmaterial (hier Plasma) vorhanden ist bestimmt. Zur Bestimmung von MDA mittels HPLC wurde die modifizierte Methode von Wong angewandt (Wong et al., 1987).

### 3.10.1.1 Prinzip

Malondialdehyd ist ein Produkt der Lipidperoxidation, das durch radikalische Oxidation von ungesättigten Fettsäuren gebildet wird. Da man MDA nicht direkt bestimmen kann, wird dem Reaktionsansatz Thiobarbitursäure (TBA) zugegeben. Der durch das Kochen im phosphorsaurem Medium entstandene MDA-TBA-Komplex wird mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) fluorimetrisch bei einer Wellenlänge von  $\text{EM} = 563 \text{ nm}$  und  $\text{Ex} = 532 \text{ nm}$  bestimmt. Eventuell andere gebildete Aldehyde aus der Lipidoxidation werden mit der Trennsäule abgetrennt.

### 3.10.1.2 Geräte

- HPLC: Merck
- Pumpe: Hitachi Model L-7100
- Säule: Merck LichroCART 125-4 Lichrospher 100 RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ )
- Vorsäule: Merck LichroCART 250-4 Lichrospher 100 RP-18 ( $10 \mu\text{m}$ )
- Detektor: Hitachi Model F-1050 Fluorescence Spectralphotometer
- Integrator: Hitachi Model D-7500
- Injektor:  $20 \mu\text{l}$  Schleife
- Wasserbad, Hamiltonspritze, Pyrexgläser

### 3.10.1.3 Reagenzien

#### Laufmittel:

- Phosphatpuffer: Methanol im Verhältnis 60:40
- Phosphatpuffer pH 6,8
- Methanol chromasolv von Riedel de Haen
- Wasser bidest.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Herstellung: 6,8 g Kaliumdihydrogenphosphat in 800 ml Wasser bidest. lösen, mit 1M KOH (Kaliumhydroxid) den pH Wert auf 6,8 einstellen und mit Wasser bidest. auf 1 Liter auffüllen

### Standards:

- Tetraethoxypropan (TEP) von Sigma für die Herstellung der Standards
- Ethanol 96 Vol % p.a. von Riedel de Haen
- Wasser bidest.

### Reaktionsansatz:

- Ortho-Phosphorsäure 0,44 mol/l (Dichte 1,69 g/ml)

Herstellung: 3 ml konz. Ortho-Phosphorsäure in 100 ml Wasser bidest. lösen

- Thiobarbitursäurelösung (TBA)

Herstellung: 0,3 g Thiobarbitursäure von Sigma in 100 ml Wasser bidest. lösen

- 1 N Natronlauge (4 g Ätznatron in 100 ml Wasser bidest. lösen)
- Methanol/Natronlauge

Herstellung: 4,5 ml 1 N NaOH in 50 ml Methanol chromasolv von Riedel de Haen lösen

### Messbedingungen:

- Detektoreinstellungen: Emissionswellenlänge EM = 563 nm  
Excitationswellenlänge Ex = 532 nm
- Sensitivity: 5
- Fließmittel: Phosphatpuffer:Methanol 60:40 (pH 6,8)
- Fließrate: 1 ml/min
- Laufzeit: 5 min

### 3.10.1.4 Durchführung

Herstellung der Standardreihe:

- STOCK 1: 50 µl TEP im 50 ml Ethanol-Wasser-Gemisch (50:75) lösen
- STOCK 2: 100 µl vom Stock 1 auf 50 ml mit Ethanol-Wasser-Gemisch auffüllen

Aus dem Stock 2 mit der Konzentration von 8,12 µM werden die Standardlösungen hergestellt (Tabelle 5).

Standard	Lösungen	Konzentration
1	Wasser bidest.	0 µM
2	200 µl vom Standard 3 + 200 µl Wasser bidest.	0,195 µM
3	100 µl vom Standard 8 + 2000 µl Wasser bidest.	0,39 µM
4	100 µl vom Standard 8 + 900 µl Wasser bidest.	0,81 µM
5	200 µl vom Standard 8 + 1000 µl Wasser bidest.	1,35 µM
6	250 µl vom Standard 8 + 750 µl Wasser bidest.	2,03 µM
7	250 µl vom Standard 8 + 250 µl Wasser bidest.	4,06 µM
8	Stock 2	8,12 µM

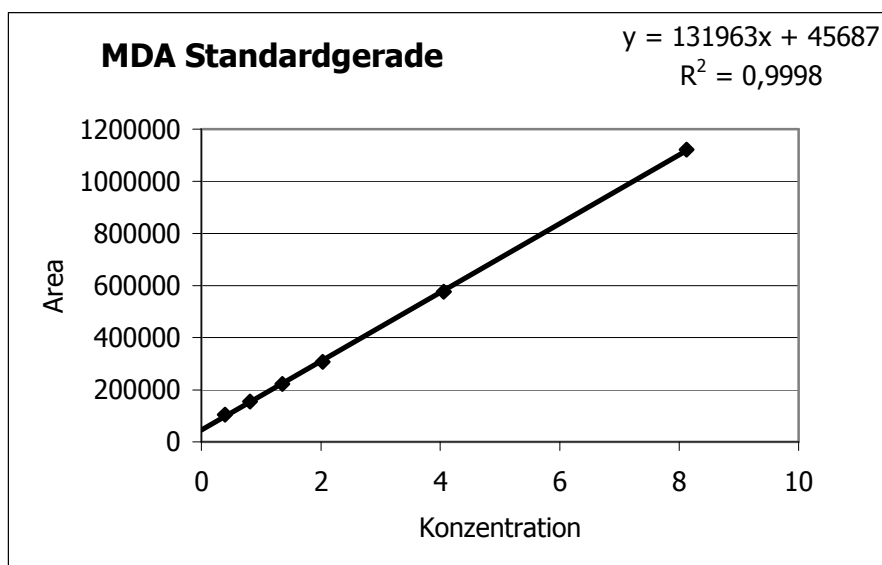
**Tabelle 5: Schema zur Herstellung der MDA-Standardlösungen**

50 µl von der Probe, den Standards bzw. vom Leerwert (H<sub>2</sub>O bidest.) wurden mit jeweils 700 µl Phosphorsäure, 500 µl Wasser und mit 250 µl TBA-Lösung in Pyrexgläser pipettiert und geschüttelt. Dann wurden die Proben für 60 Minuten bei einer Temperatur von 100°C im Wasserbad gekocht. MDA reagiert während des Kochvorganges mit Thiobarbitursäure unter Bildung eines rosa gefärbten Komplexes. Anschließend wurden die Proben ins Eiswasserbad zum Abkühlen gestellt. Nach dem Abkühlen (etwa 10-15 min) wurde mit einer eisgekühlten Methanol:Natronlauge-Lösung neutralisiert. Das Methanol verursacht im Plasma das Ausfallen des Eiweißes und die Natronlauge neutralisiert die Phosphorsäure. Hierfür wurden 100 µl Methanol:NaOH mit 100 µl Probe/Standard/Leerwert versetzt, geschüttelt und für 2 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Weiters wurde

der pH-Wert mittels Indikatorpapier auf Neutralität (pH 7) überprüft. Dies war 1 x pro Messansatz notwendig. Anschließend wurden 20 µl des Gemisches mittels HPLC analysiert.

### 3.10.1.5 Auswertung

Die Konzentration (µmol/l) wurde über eine lineare Regression der Standards berechnet (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Standardgerade MDA**

$$y = k \cdot x + d$$

y...Absorption

k...Steigung der Konzentrationsgeraden einer Probe

x...Konzentration [µmol/l]

d...Schnittpunkt der Konzentrationsgeraden einer Probe mit der y-Achse

Die Konzentration ergibt sich durch die Umformung der Formel nach x.

$$x = (y - 45687) / 131963$$

Der Variationskoeffizient der Methode betrug 6%.



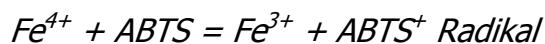
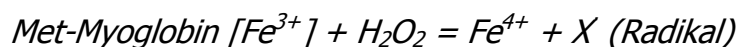
### 3.10.2 Totale antioxidative Kapazität TAC

Die Bestimmung der gesamten oxidativen Kapazität im Plasma erfolgte nach einer von Rice-Evans und Miller entwickelten Methode (Rice-Evans & Miller, 1994), welche am Institut für Ernährungswissenschaften modifiziert durchgeführt wurde.

#### 3.10.2.1 Prinzip

Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Antioxidantien die Absorption des  $ABTS^+$ -Radikal-Kations [2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)] hemmen. Das Radikalkation  $ABTS^+$  wird durch die Reaktion von Metmyoglobin mit  $H_2O_2$ , wodurch das Ferrylmyoglobinradikal entsteht, das seinerseits die Reaktion des ABTS zum  $ABTS^+$ -Radikal anregt, gebildet. Dieses Radikalkation ist blaugrün gefärbt und wird bei einer Wellenlänge von 734 nm gemessen. Die Unterdrückung der Radikalbildung ist direkt proportional zur Konzentration an Antioxidantien im Plasma, d. h. je mehr wasserlösliche Antioxidantien in einer Plasmaprobe enthalten sind, desto stärker wird die Radikalwirkung unterdrückt und desto geringer ist die Konzentration.

Reaktion:



*blaugrün gefärbt, photometrisch gemessen*

#### 3.10.2.2 Geräte

- Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 2 mit entsprechender
- Software
- Wasserbad

### 3.10.2.3 Reagenzien

- PBS-Puffer
- Myoglobin
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)
- ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))
- 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### PBS-Puffer:

- 8,2 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1 l Wasser bidest.

Alle Substanzen werden in bidestilliertem Wasser gelöst, auf einen pH Wert von 7,4 (z. B. mit 1 N HCL) eingestellt und danach auf 1 l aufgefüllt. Vor jedem neuen Analysetag muss der pH-Wert gemessen werden!

#### Metmyoglobin:

Wird vor dem Gebrauch auf einer 35 x 2,5 cm Sephadex G-15-120 Säule in PBS gereinigt. Vor der Verwendung muss die Säule für mindestens 30 min mit PBS gespült werden.

#### Einwaage:

- Lösung 1: 75,2 mg Metmyoglobin in 10 ml PBS (400 µM)
- Lösung 2: 24,4 mg Eisencyanid in 100 ml PBS

#### Lösung zur Reinigung:

10 ml Lösung 1 wurden mit 10 ml der Lösung 2 vermischt. Diese Mixtur wird auf die Säule aufgebracht und mit PBS eluiert. Die erste Fraktion wird

gesammelt und anschließend bei den Wellenlängen 490, 560, 580 und 700 nm gemessen. Die Absorption bei 700 nm wird von jenen bei 490, 560 und 580 nm subtrahiert, um die Hintergrundabsorption zu korrigieren.

Die Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$MetMb = 146 \times A_{490} - 108 \times A_{560} + 2,1 \times A_{580}$$

### Trolox:

Erstellung der Stammlösung: 156,41 mg Trolox wurden in 250 ml PBS gelöst. Die Arbeitsstandards wurden vor jedem Analysetag frisch zubereitet (Tabelle 6).

Konzentration	Trolox	Puffer
2,5 mM	500 µl	0 µl
2,0 mM	400 µl	100 µl
1,5 mM	300 µl	200 µl
1,0 mM	200 µl	300 µl
0,5 mM	100 µl	400 µl

**Tabelle 6: Herstellung der Arbeitsstandards bei der TAC-Bestimmung**

### ABTS:

Herstellung: 27,43 mg ABTS wurden mit 10 ml PBS gelöst. Der millimolare Extinktionskoeffizient bei 340 nm ist 18,8.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%:

Lösung A: 515 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden auf 10 ml mit PBS aufgefüllt (500 mM)

Für die Arbeitslösung werden 45 µl der Lösung A mit PBS auf 50 ml aufgefüllt.

### 3.10.2.4 Durchführung

Parallel zu den Plasmaproben wurden immer ein Leerwert und eine Trolox-Standardreihe gemessen. Die Reagenzien wurden nach folgendem Pipettierschema in Epruvetten vermischt (Tabelle 7).

Substanz	Probe	Standard	Leerwert
PBS-Puffer*	400 µl	410 µl	410 µl
Trolox-Standard	-	10 µl	-
Plasma-Probe	20 µl	-	-
Metmyoglobin	20 µl	20 µl	20 µl
ABTS*	400 µl	400 µl	400 µl
Vor dem Starten der Reaktion muss der Ansatz gut gemischt werden.			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	170 µl	170 µl	170 µl
Mit Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> wird die Reaktion gestartet. Erneut muss der Ansatz gut gemischt werden. Es folgt eine Inkubation bei 30°C über 6 min, bevor die Absorption bei 734 nm gemessen wird.			

\*Vor der Verwendung mussten ABTS und PBS mindestens für 15 min im Wasserbad auf 30°C erwärmt werden.

**Tabelle 7: Pipettierschema zur Bestimmung der totalen antioxidativen Kapazität**

### 3.10.2.5 Auswertung

Um den Prozentsatz der Hemmung zu errechnen, muss die Differenz der Absorption von Leerwert und Probe durch die Absorption des Leerwertes dividiert und mit 100 multipliziert werden.

$$(\text{Leerwert}_{\text{Abs.}} - \text{Plasma}_{\text{Abs.}} / \text{Standard}_{\text{Abs.}}) / \text{Leerwert}_{\text{Abs.}} * 100 = \% \text{ Hemmung}$$

Mit Hilfe einer linearen Regression, die auf der Eichgeraden der Trolox-Standards basiert, kann anschließend die Trolox equivalent antioxidant capacity

(TEAC) oder die totale antioxidative Kapazität (TAC) in mmol errechnet werden. Der Variationskoeffizient lag bei 5%.

### **3.10.3 Ferric Reducing Antioxidant Power Assay FRAP**

#### **3.10.3.1 Prinzip**

FRAP ist eine Methode zur Erfassung der antioxidativen Kapazität. Die in der Probe enthaltenen Antioxidantien reduzieren  $\text{Fe}^{3+}$  (oxidiertes Eisen) zu  $\text{Fe}^{2+}$  (reduziertes Eisen), wobei ein blaufarbter Komplex entsteht, der photometrisch bestimmt werden kann. Je mehr Antioxidantien in der Probe vorhanden sind, umso mehr  $\text{Fe}^{2+}$  wird gebildet und umso intensiver ist die Farbentwicklung. Die Originalmethode stammt von Benzie und Strain (Benzie & Strain, 1996). Verwendet wurde die von meiner Kollegin Judith Valentini etablierte Form daraus (Valentini, 2009).

#### **3.10.3.2 Geräte**

- FLUOstar optima, Mikroplattenlesegerät
- Mikrotiterplatten (Bibby Sterilin Ltd. Stone, Staffs, U.K;
- Eppendorfpipette
- Wasserbad

#### **3.10.3.3 Reagenzien**

In Tabelle 8 sind die Herstellungsvorgänge der einzelnen FRAP-Reagenzien dargestellt.

Reagenz	Konzentration	Herstellung	Anmerkung
25 ml Acetatpuffer	300 mmol/l	3,1 g Natriumacetat + 16 ml Essigsäure + Wasser bidest. auf 1 Liter auffüllen	pH: 3,5 einstellen Im Dunkeln herstellen und aufbewahren
2,5 ml TPTZ [2,4,6-Tri(2- pyridyl)-s- triazine]	10 mmol/l in 40 mmol HCl	0,312 g TPTZ + 585 µl HCl (25 %) + Wasser bidest. auf 100 ml auffüllen	Im Dunkeln herstellen und aufbewahren
2,5 ml Eisen-III- Chlorid	20 mmol/l	0,541 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ + Wasser bidest. auf 100 ml auffüllen	Im Dunkeln herstellen und aufbewahren

**Tabelle 8: Reagenzienherstellung der FRAP-Bestimmung**

Das FRAP Reagenz musste täglich frisch präpariert und bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt werden.

### Ausgangsstandard:

- Eisen(II)sulfat-Heptahydrat mit einer Konzentration von 2000 µmol/l  
Herstellung: 0,0556 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + Wasser bidest. auf 100 ml auffüllen. Im Dunkeln herstellen und aufbewahren.

In Tabelle 9 sind die Verdünnungen der Ausgangskonzentration zur Erstellung einer Standardgerade dargestellt.

Lösung	Konzentration	Herstellung
1	2000 µmol/l	Ausgangskonzentration
2	1500 µmol/l	37,6 ml (Lsg. 1) + 12,4 ml Wasser bidest.
3	1250 µmol/l	41,7 ml (Lsg. 2) + 8,3 ml Wasser bidest
4	1000 µmol/l	40 ml (Lsg. 3) + 10 ml Wasser bidest.
5	500 µmol/l	25 ml (Lsg. 4) + 25 ml Wasser bidest.
6	250 µmol/l	25 ml (Lsg. 5) + 25 ml Wasser bidest.
7	100 µmol/l	20 ml (Lsg. 6) + 30 ml Wasser bidest.

**Tabelle 9: Herstellung der Standards für die FRAP-Bestimmung**

## Kontrolle:

Die im Rahmen der Versuche verwendete Trolox-Lösung hatte eine Konzentration von 2500 µmol/l und wurde im Dunkeln gelagert.

In Tabelle 10 sind die einzelnen Schritte zur Herstellung der Verdünnungsreihe aufgelistet.

Lösung	Konzentration	Herstellung
1	2500 µmol/l	Ausgangskonzentration
2	2000 µmol/l	80 µl (Lsg. 1) + 20 µl Wasser bidest.
3	1000 µmol/l	50 µl (Lsg. 2) + 50 µl Wasser bidest.
4	500 µmol/l	50 µl (Lsg. 3) + 50 µl Wasser bidest
5	250 µmol/l	50 µl (Lsg. 4) + 50 µl Wasser bidest.
6	100 µmol/l	40 µl (Lsg. 5) + 10 µl Wasser bidest.

**Tabelle 10: Schema zur Herstellung der Verdünnungsreihe der FRAP-Bestimmung**

## Messbedingungen:

Die Messung wurde an einem Mikroplattenlesegerät der Firma BMG Labortechnologies (Deutschland) durchgeführt. In Tabelle 11 sind die

Grundeinstellungen der Software FLUOstar Optima Version 1.20-0 aufgelistet. Die Messung wurde bei 540 nm durchgeführt, da die optimale Wellenlänge von 595 nm am Gerät nicht einstellbar ist. Ein Zeitfenster von 6 min wurde gewählt (laut Benzie, 1996 ist der Endpunkt der Reaktion nach 4 min erreicht). Die Temperatur während der Messung musste 37°C betragen. Das FRAP Reagenz musste auf 37°C im Wasserbad erwärmt werden. Für jeden Durchlauf musste ein Programm erstellt werden.

Bezeichnungen:	FRAP
Mikroplatten:	96-Well Mikrotiterplatten
Messmode:	Absorption
Wellenlänge:	540 nm
Temperatur:	37°C
Beginn der Messung:	1 sek
Anzahl der Messungen:	10
Intervall zwischen den Messungen:	36 sek
Mischen:	5 sek vor der ersten Messung

**Tabelle 11: Grundeinstellungen an der FLUOstar Optima Software**

### **3.10.3.4 Durchführung**

Für die Messung wurden zwei Platten parallel nebeneinander verwendet. Während der Befüllung der einen Platte (Tabelle 12) wurde die andere Platte gemessen. Für die Doppelbestimmung wurden pro Durchlauf je zwei Reihen befüllt (Tabelle 13). Standard, Kontrolle oder Probe wurden zuerst mit Hilfe der Eppendorfpipette in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von Wasser. Das FRAP Reagenz wurde erst knapp vor dem Messen hinzugegeben, da die Reaktion sofort abläuft. Auf keinen Fall sollte mehr als eine Minute zwischen der Zugabe der FRAP-Lösung und dem Beginn der Messung liegen. Das Programm ist so programmiert, dass es 6 min lang



läuft. In diesen 6 min werden die Proben die ersten 5 Sekunden lang geschüttelt und dann im Intervall von 36 Sekunden immer wieder gemessen. Danach erhält man den Endwert, der gegen einen Blindwert (Blank) gemessen wurde.

in die Vertiefungen pipettieren	Standard	Blank	Kontrolle	Probe
Fe <sup>2+</sup> (100-2000 µmol/l)	10 µl	-	-	-
Trolox	-	-	10 µl	-
Plasma	-	-	-	10 µl
Wasser bidest.	30 µl	40 µl	30 µl	30 µl
FRAP Reagenz	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

**Tabelle 12: Mengenangaben, die in die Platten gefüllt werden für die FRAP-Analyse**

Es wurde folgende Messreihenfolge eingehalten (Tabelle 13):

1. Eisenstandards (Platte 1, Reihe 1-2 - Fe<sup>2+</sup>)
2. Leerwert (Platte 2, Reihe 1-2 - LW)
3. Kontrolle (Platte 1, Reihe 3-4 - Trol.)
4. Proben (Platte 2, Reihe 3-4 Pr.)
5. Proben (Platte 1, Reihe 5-6 Pr.) usw.

Pl. 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.1	Pr.1	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
B	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.2	Pr.2	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
C	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.3	Pr.3	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
D	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.4	Pr.4	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
E	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.5	Pr.5	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
F	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.6	Pr.6	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
G	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.7	Pr.7	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
H	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Trol.	Trol.	Pr.8	Pr.8	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.

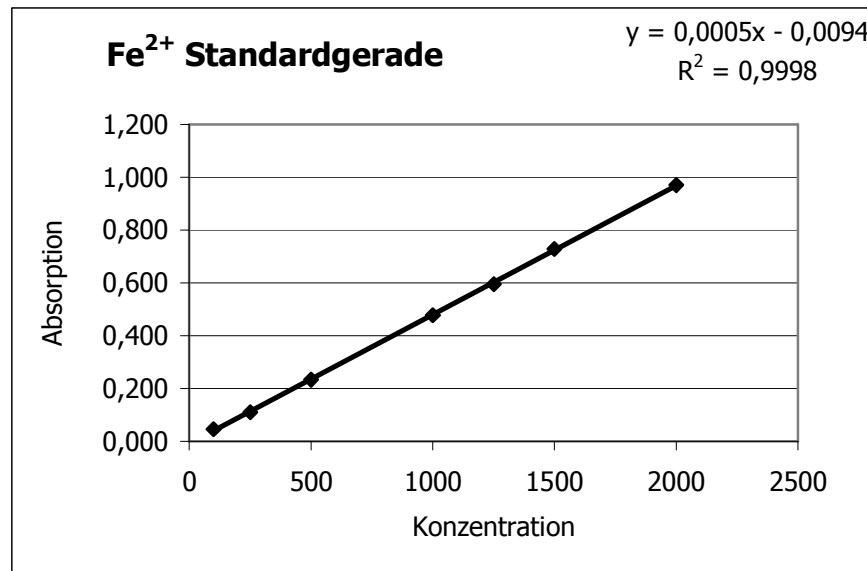
Pl. 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
B	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
C	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
D	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
E	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
F	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
G	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.
H	LW	LW	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.	Pr.

Fe<sup>2+</sup>: Eisenstandard, Trol.: Trolox, Pr.: Probe, LW: Leerwert

**Tabelle 13: Platte 1 und 2, mit der Verteilung der Proben auf der Mikrotiterplatte**

### 3.10.3.5 Auswertung

Die Berechnung erfolgte anhand der  $\text{Fe}^{2+}$  Standardgerade (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Eisenstandardgerade**

$$y = k \cdot x + d$$

y...Absorption

k...Steigung der Konzentrationsgeraden einer Probe

x...Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]

d...Schnittpunkt der Konzentrationsgeraden einer Probe mit der y-Achse

Der FRAP Wert ergibt sich durch die Umformung der Formel nach x.

$$x = (y + 0,0094) / 0,0005$$

Der Variationskoeffizient bei dieser Methode betrug 8,4%.

### **3.10.4 Hämoglobin**

#### **3.10.4.1 Prinzip**

Die Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration im Plasma war notwendig, um eine mögliche Hämolyse, die die Ergebnisse der anderen Methoden verfälscht hätte, auszuschließen. Das im Plasma freigesetzte Hämoglobin wird durch Kaliumhexacyanoferrat (III) zu Hämoglobin oxidiert, welches anschließend mit Kaliumcyanid zu einem stabilen Farbkomplex, dem Hämoglobincyanid, reagiert. Die Farbintensität wurde photometrisch bei 546 nm gemessen (modifizierte Methode von Van Kampen, 1961).

#### **3.10.4.2 Geräte**

- Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 2
- Makroküvetten (Sterilin, Disposable Cuvette, semi-micro)

#### **3.10.4.3 Reagenzien**

Herstellung des Hämoglobinreagenz:

- 198 mg Kaliumhexacyanoferrat (III) +
- 49 mg Kaliumcyanid (giftig) mit Wasser bidest. auf 1 l auffüllen.

#### **3.10.4.4 Durchführung**

Es wurden 50 µl Plasma in 5 ml Kaliumhexacyanoferrat-III-/KCN-Lösung hinzupipettiert. Diese Mischung gut mischen und für mindestens 30 Minuten im Dunkeln inkubieren lassen. Für die Messung wurde die Lösung in Makroküvetten überführt und photometrisch bei 546 nm gemessen.

#### **3.10.4.5 Auswertung**

In der Literatur (Van Kampen & Zijlstra, 1961) wird für ein Probenvolumen von 20 µl Vollblut + 5 ml Kaliumhexacyanoferrat-III-/KCN-Lösung ein Verdünnungsfaktor von 36,77 verwendet. Da in dieser Studie ein Plasmavolumen von 50 µl + 5 ml Kaliumhexacyanoferrat-III-/KCN-Lösung verwendet wurde, wird ein Verdünnungsfaktor von 14,71 herangezogen.

$$c[g/dl] = E * 14,71$$

$c[g/dl]$  = Hämoglobin-Konzentration  
E = Extinktion (gegen Wasser gemessen)

Der Variationskoeffizient für diese Methode betrug 1%.

### **3.11 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Windows, Version 15.0 und Excel 2003. Es wurden für alle gemessenen Parameter die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Die Werte wurden mittels Kolgomorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Davor wurden die Werte ausreißerbereinigt. Als Testverfahren wurde die Oneway Anova mit dem Post-Hoc-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

### **4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

Anhand dieser Studie sollen die Einflüsse von POPs auf oxidative Parameter im Plasma dargestellt werden. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der vier Messmethoden grafisch dargestellt und diskutiert. Den Blutproben, die von fünf Probandinnen stammten, wurden verschiedene Phytosteroloxidaationsprodukte in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt (Kapitel 3.7.1).

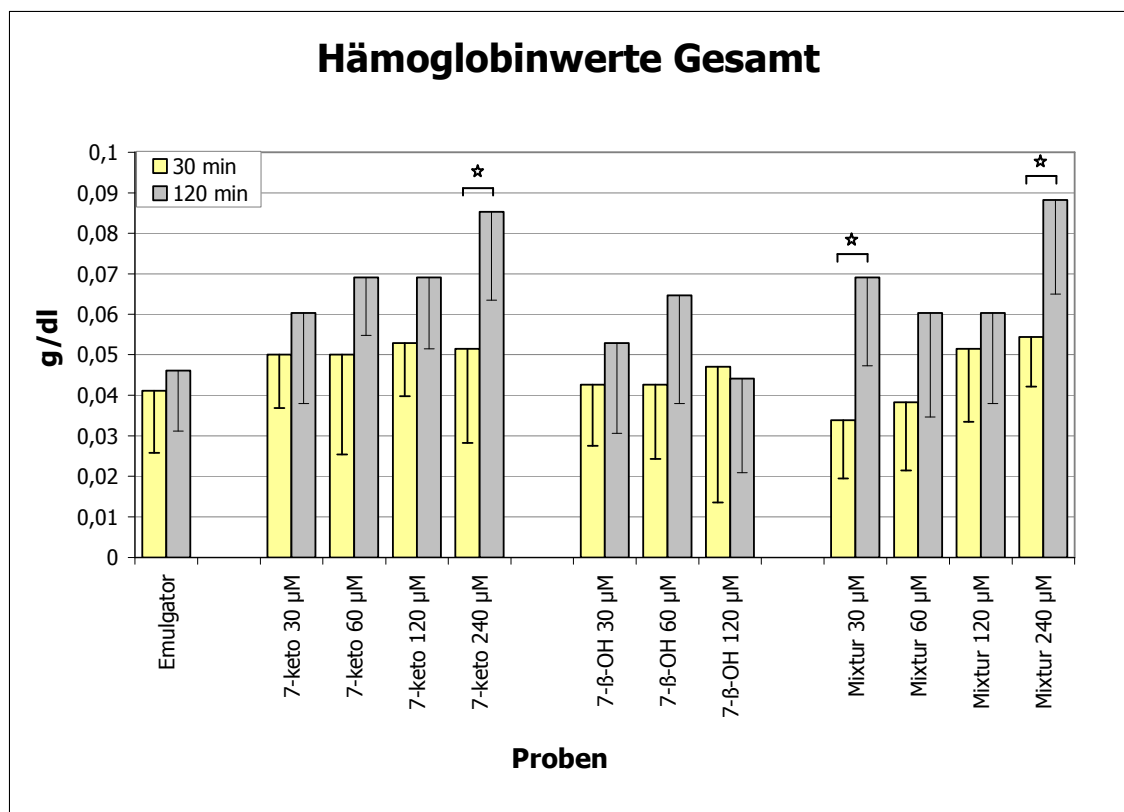
Die drei verschiedenen Emulgatorkonzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Daher wurde der berechnete Mittelwert dieser drei Konzentrationen für die statistische Auswertung der Ergebnisse verwendet.

Da der Vergleich zwischen Kontrollblut und dem Mittelwert der Emulgatorproben keine signifikanten Unterschiede zeigte, wurde der Mittelwert der Emulgatorkonzentrationen für die statistische Auswertung als Kontrolle herangezogen.

## 4.1 Hämoglobin

### 4.1.1 Gesamtergebnisse der Hämoglobinbestimmung

Die Werte der Hämoglobinmessungen (Abbildung 7) lagen zwischen  $0,034 \pm 0,014$  g/dl (Mixtur 30  $\mu$ M – 30 min) und  $0,088 \pm 0,023$  g/dl (Mixtur 240  $\mu$ M – 120 min). Im Vergleich zu 7-Keto 240  $\mu$ M – 30 min zeigte 7-Keto 240  $\mu$ M – 120 min einen signifikanten Anstieg von  $0,051 \pm 0,023$  g/dl auf  $0,085 \pm 0,022$  g/dl. Der Wert  $0,034 \pm 0,014$  g/dl von Mixtur 30  $\mu$ M – 30 min erhöhte sich signifikant bei Mixtur 30  $\mu$ M – 120 min auf  $0,069 \pm 0,022$  g/dl.



**Abbildung 7: Vergleich der Hämoglobinwerte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs**

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

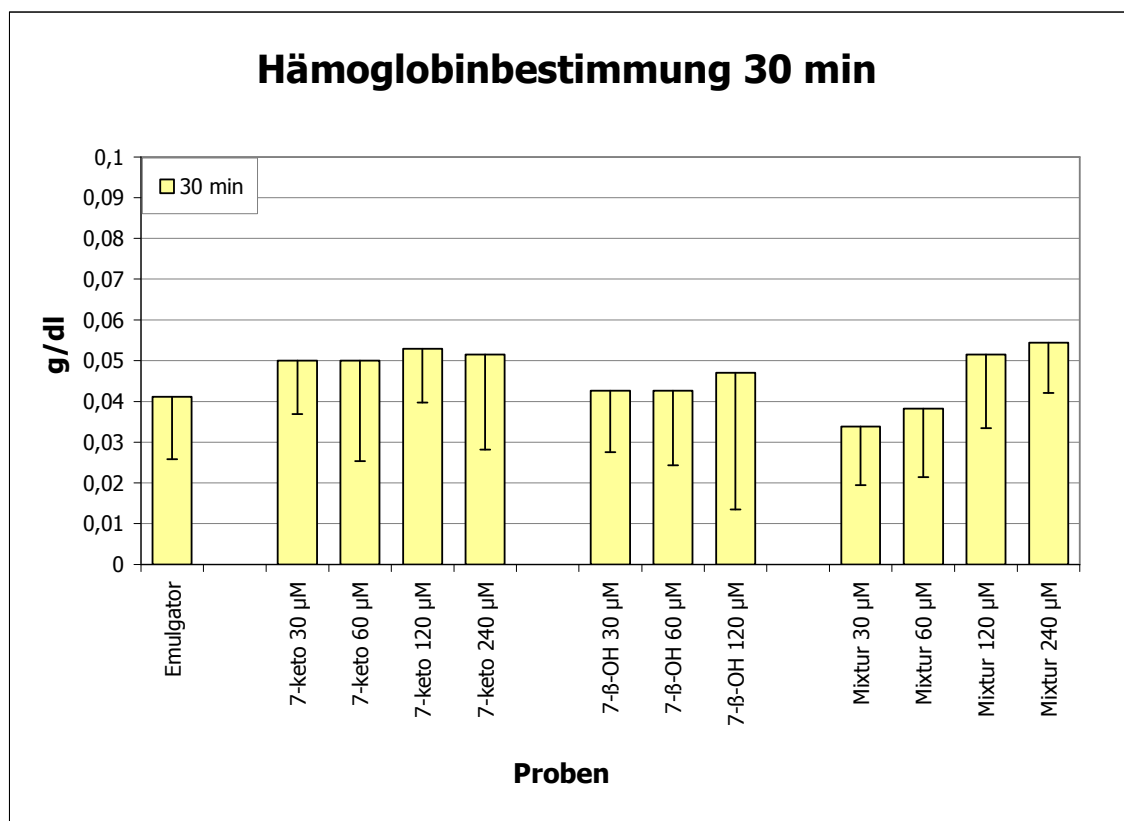
Ebenfalls einen signifikanten Anstieg zeigte die Gruppe Mixtur 240  $\mu\text{M}$ . Der Wert bei der Inkubationszeit 30 min lag bei  $0,054 \pm 0,012$  g/dl und stieg bei 120 min auf  $0,088 \pm 0,023$  g/dl an. Bis auf die Gruppe 7- $\beta$ -OH 120  $\mu\text{M}$  zeigten alle Proben mit einer Inkubationszeit von 120 min höhere aber nicht signifikante Werte als die Proben mit einer Inkubationszeit von 30 min.

Die Anstiege sind allerdings so gering, dass daraus geschlossen werden kann, dass POPs keine zelltoxische Wirkung auf die Erythrozyten haben.



#### 4.1.2 Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation

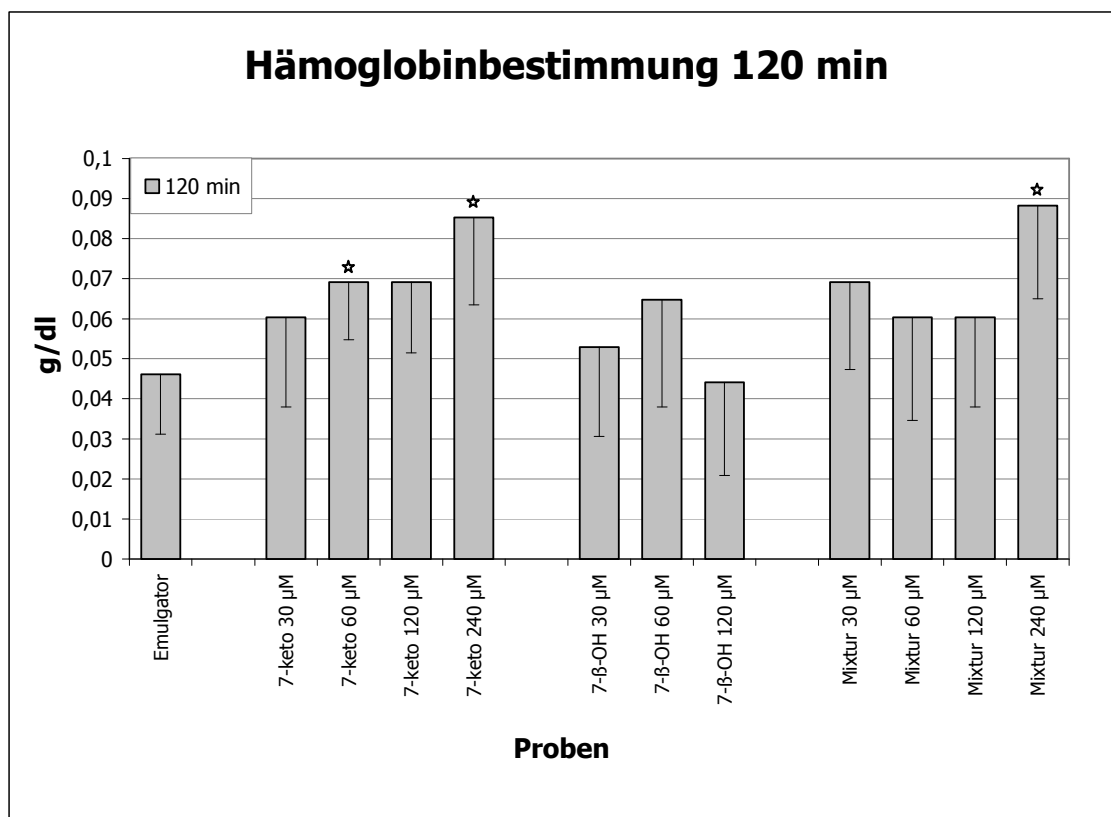
Nach einer Inkubationszeit von 30 min kam es zu keiner signifikanten Veränderung (Abbildung 8). Die Gruppen 7-Keto und 7-β-OH lagen etwas über dem Mittelwert ( $0,041 \pm 0,015$  g/dl) des Emulgators. Bei der Mixtur lagen die Werte bei den Konzentrationen 30 μM und 60 μM etwas unter dem Mittelwert des Emulgators und stiegen dann bei 120 μM und 240 μM nicht signifikant an.



**Abbildung 8: Hämoglobinwerte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs**

## 4.1.3 Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation

Eine Inkubationszeit von 120 min (Abbildung 9) zeigte bei den verschiedenen Gruppen einen Anstieg im Vergleich zum Emulgator ( $0,046 \pm 0,015$  g/dl). 7-Keto 60  $\mu$ M ( $0,069 \pm 0,014$  g/dl) sowie 240  $\mu$ M ( $0,085 \pm 0,022$  g/dl) und Mixtur 240  $\mu$ M ( $0,088 \pm 0,023$  g/dl) wiesen im Vergleich zum Emulgator einen signifikanten Anstieg auf. Bis auf 7- $\beta$ -OH 120  $\mu$ M ( $0,044 \pm 0,023$  g/dl) lagen alle Werte der verschiedenen Gruppen über dem Wert des Emulgators.



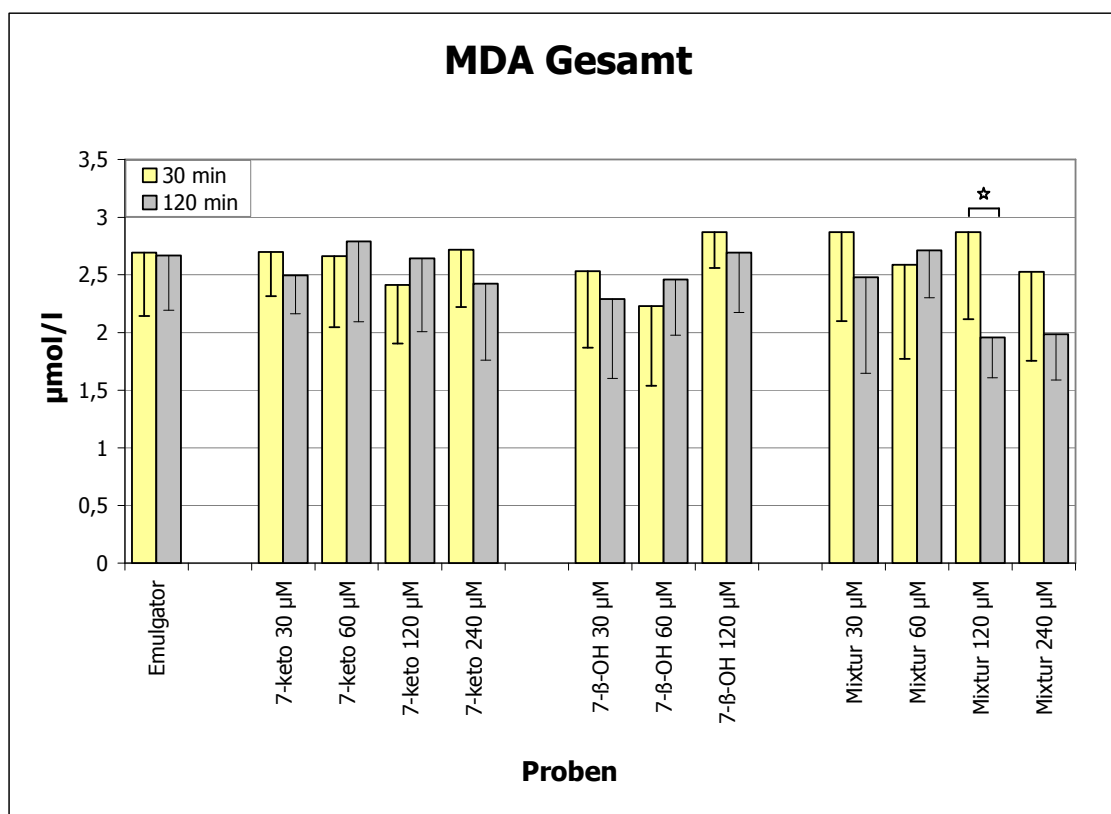
**Abbildung 9: Hämoglobinwerte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs**

Eine mögliche Hämolyse kann trotz des signifikanten Anstiegs von 7-Keto ausgeschlossen werden, da dieser sehr gering ist. Durch dieses Ergebnis konnten die drei Analysemethoden (MDA, TAC und FRAP) durchgeführt werden.

## 4.2 Malondialdehyd-MDA

### 4.2.1 Gesamtergebnisse von MDA

Zwischen den zwei verschiedenen Inkubationszeiten (Abbildung 10) zeigte sich bei MDA kein wesentlicher Unterschied. Die Mixtur 120  $\mu\text{M}$  – 30 min ( $2,87 \pm 0,76 \mu\text{mol/l}$ ) war signifikant erhöht im Vergleich zur Mixtur 120  $\mu\text{M}$  – 120 min ( $1,96 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$ ). Die Gesamtwerte lagen zwischen  $1,96 \mu\text{mol/l}$  (Mixtur 120  $\mu\text{M}$  – 120 min) und  $2,87 \mu\text{mol/l}$  (7- $\beta$ -OH 120  $\mu\text{M}$  – 30 min).



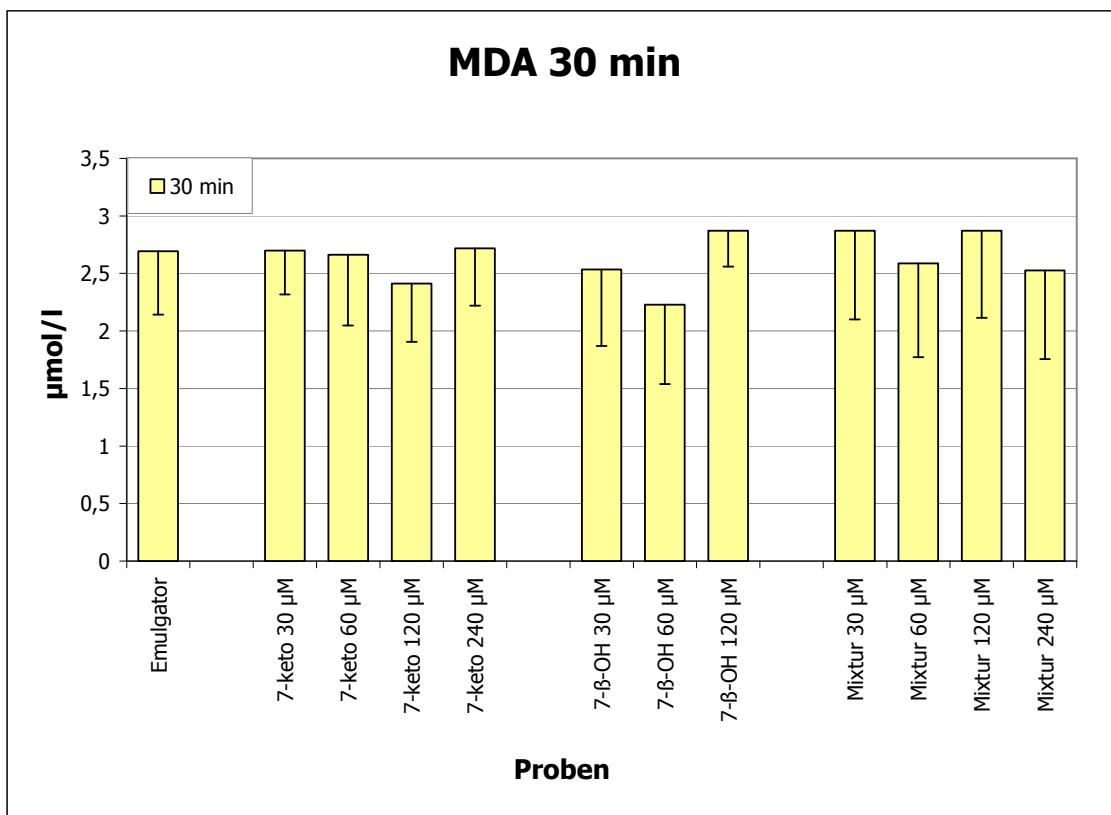
**Abbildung 10: Vergleich der MDA-Werte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs**

Da Malondialdehyd (MDA) bei peroxidativem Abbau der Lipide entsteht und die Werte nicht signifikant erhöht waren, kann darauf geschlossen werden, dass POPs nach Inkubation im Vollblut keine Lipidperoxidation induzieren.

Unter normalen Bedingungen, wenn kein Emulgator zugesetzt wird, liegen die MDA-Werte im Plasma in einer niedrigen Konzentration vor. Die Referenzwerte von Wong liegen (Wong et al., 1987) bei 0,6  $\mu\text{mol/l}$  und nach Child bei 1,5  $\mu\text{mol/l}$  (Child et al., 1998).

## 4.2.2 Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation

Nach einer Inkubationszeit von 30 min (Abbildung 11) kam es weder zu einer Erhöhung der Werte noch zu einer Senkung im Vergleich zum Emulgator ( $2,69 \pm 0,55 \mu\text{mol/l}$ ).



**Abbildung 11: MDA-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs**

### 4.2.3 Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation

Nach einer Inkubationszeit von 120 min wurde eine tendenzielle und bei zwei Werten sogar eine signifikante Senkung der MDA-Konzentration festgestellt (Abbildung 12). Mixtur 120  $\mu\text{M}$  ( $1,96 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$ ) und Mixtur 240  $\mu\text{M}$  ( $1,99 \pm 0,39 \mu\text{mol/l}$ ) waren im Vergleich zum Emulgator ( $2,67 \pm 0,48 \mu\text{mol/l}$ ), signifikant niedriger. Die 7- $\beta$ -OH Gruppe zeigte, dass bei einer niedrigen Konzentration an Phytosteroloxidaionsprodukten die Werte unter dem Wert des Emulgators lagen. Mit jeder Erhöhung der Konzentration kam es zu einem kontinuierlichen, nicht signifikanten Anstieg der MDA-Werte.

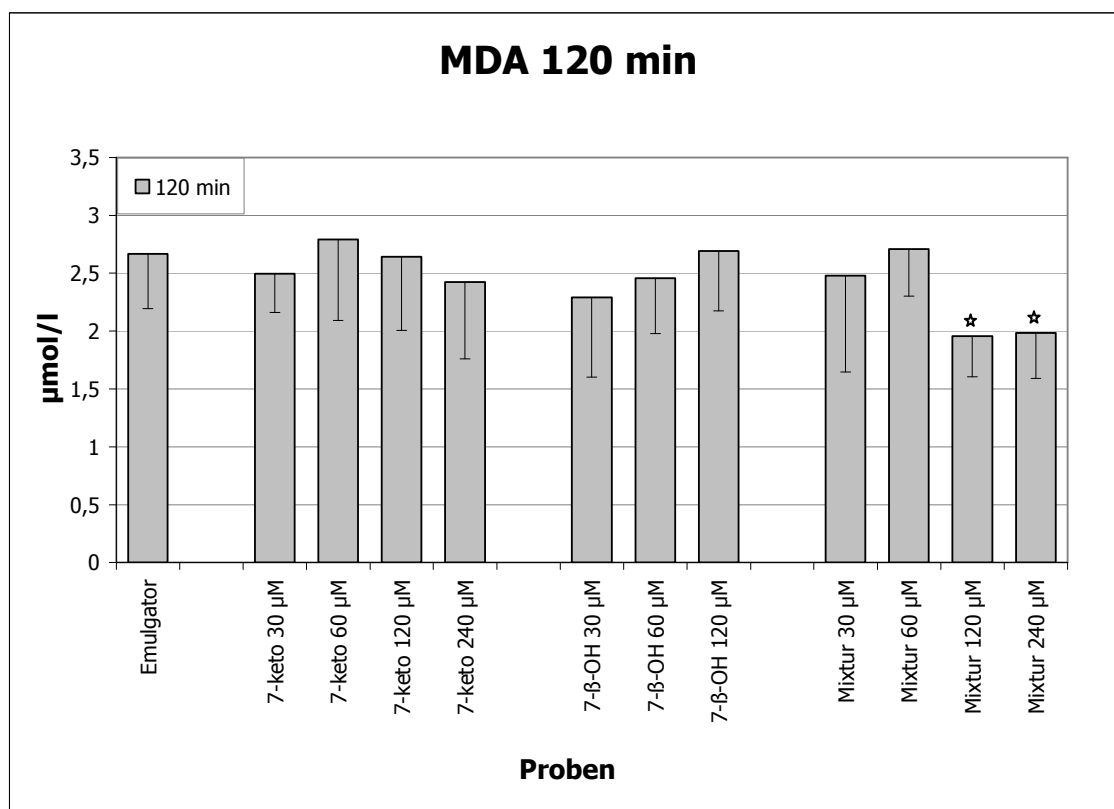


Abbildung 12: MDA-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs

In einer Studie von Karin Koschutnig wurden dieselben Phytosteroloxidationsprodukte in Zellkulturen analysiert. 120  $\mu$ M 7-Keto erhöhten MDA, wohingegen die MDA-Werte von 7- $\beta$ -OH und der Mixtur nicht signifikant erhöht waren (Koschutnig et al., 2009).

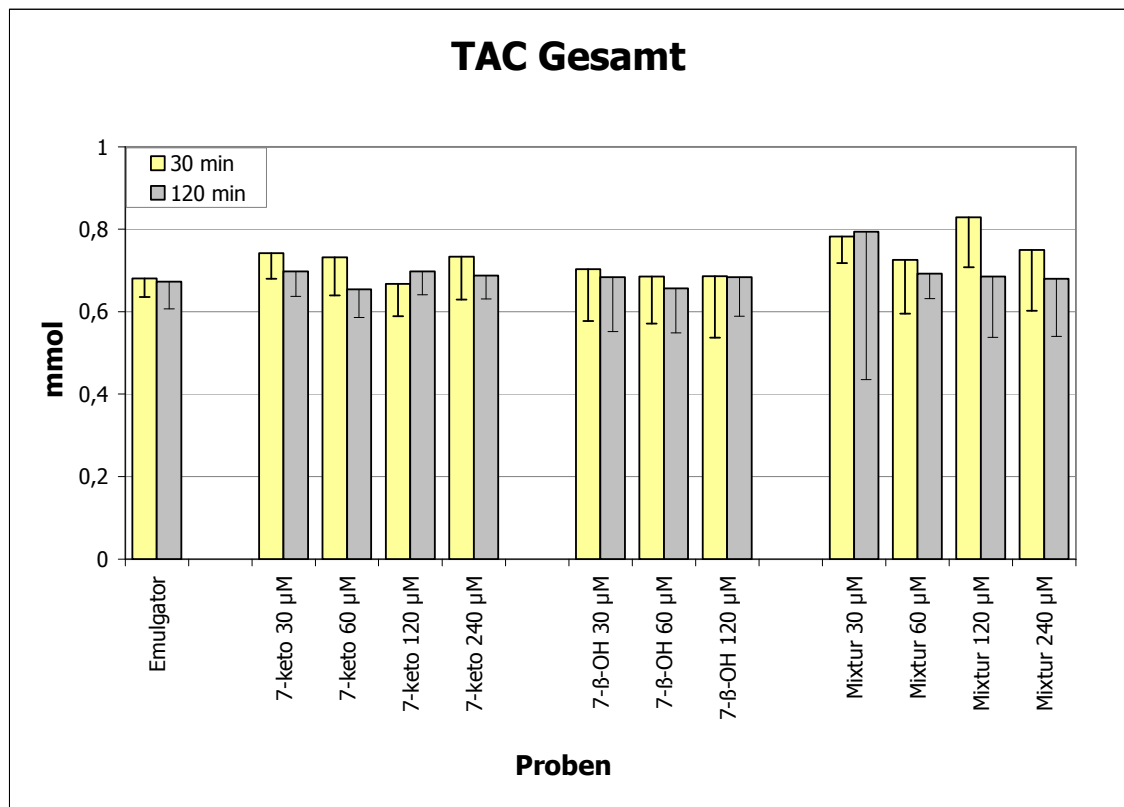
In einer Humanstudie von De Jong konsumierten die Probanden vier Wochen lang eine Kontrollmargarine, die nicht mit Sterolen und Stanolen angereichert war. Für die nächsten 16 Wochen wurden die Probanden in drei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe konsumierte die Kontrollmargarine weiter, eine Gruppe die sterolangereicherte und eine Gruppe die stanolangereicherte Margarine. Am Ende dieser Studie wurden keine signifikanten Effekte auf die oxidativen Stressmarker festgestellt (De Jong et al., 2008).



## 4.3 Totale antioxidative Kapazität TAC

### 4.3.1 Gesamtergebnisse von TAC

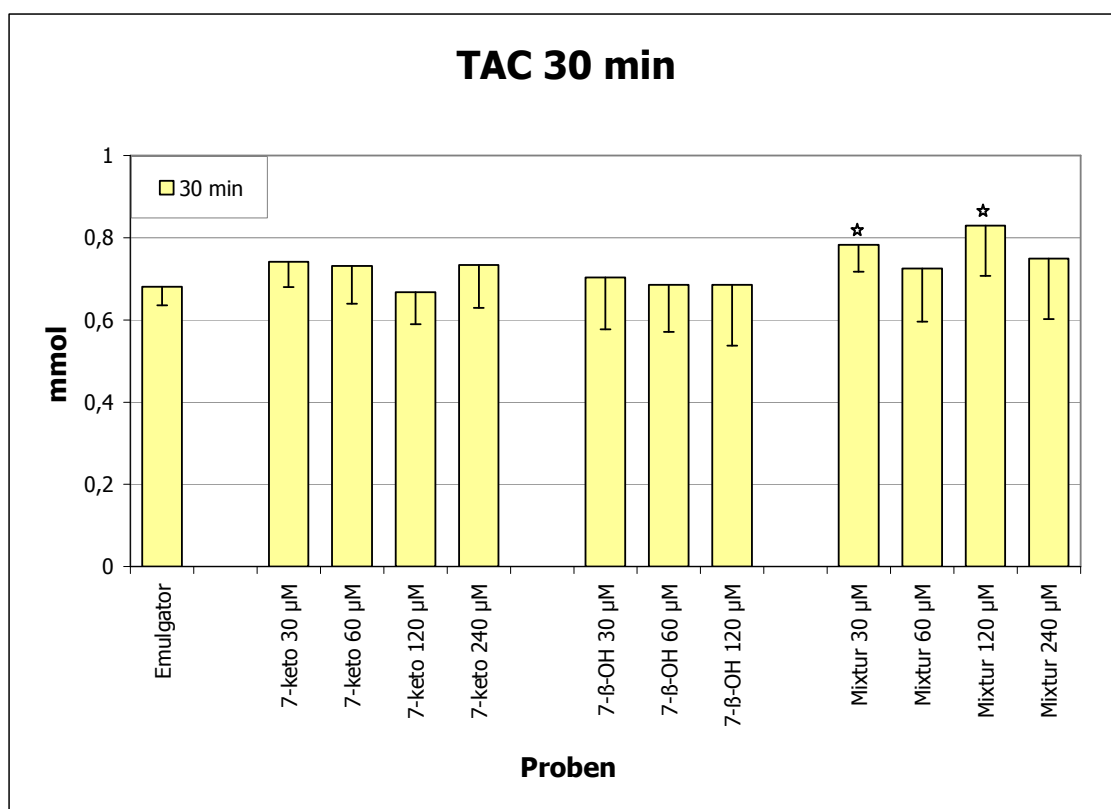
Allgemein zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 13) zwischen den verschiedenen Phytosteroloxidaionsprodukten und dem Emulgator. Die Gesamtwerte lagen zwischen  $0,65 \pm 0,07$  mmol (7-Keto 60  $\mu$ M – 120 min) und  $0,83 \pm 0,12$  mmol (Mixtur 120  $\mu$ M – 30 min).



**Abbildung 13: Vergleich der TAC-Werte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs**

## 4.3.2 Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation

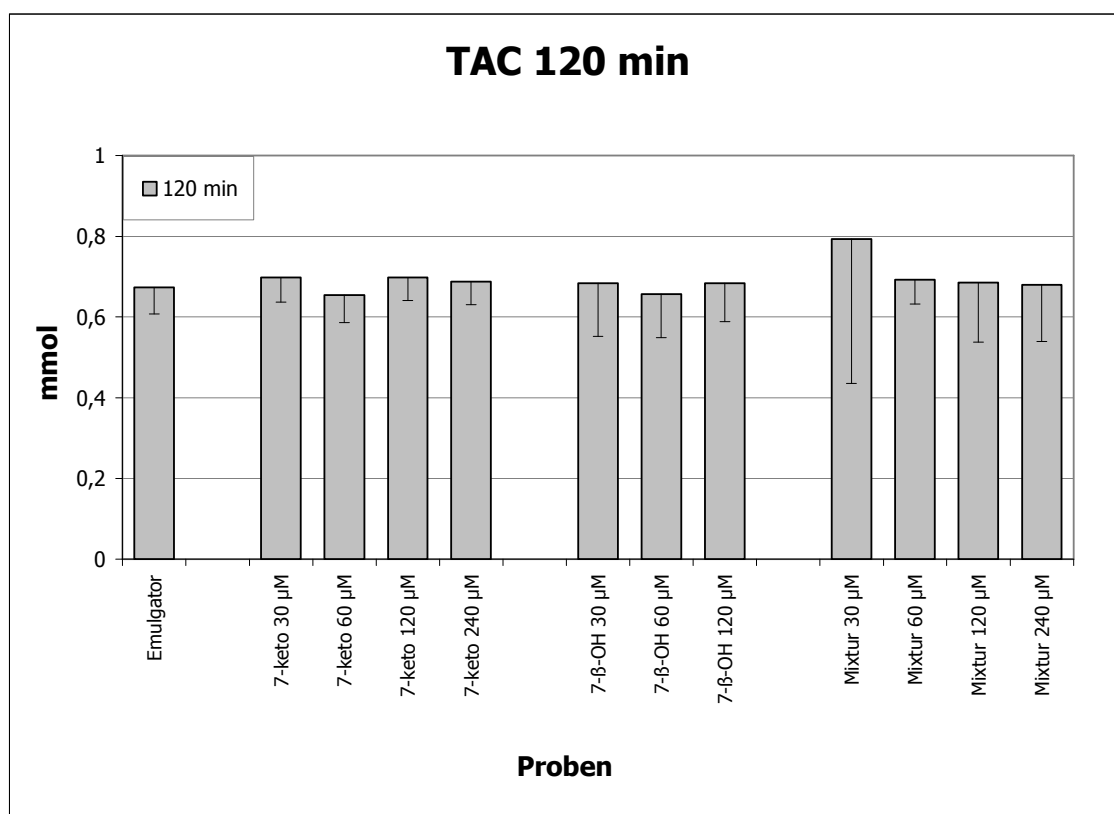
Tendenziell lagen die Werte über dem Ausgangswert des Emulgators (Abbildung 14). Zu einer signifikanten Erhöhung im Vergleich zum Emulgator ( $0,68 \pm 0,05$  mmol) kam es bei der Mixtur 30  $\mu\text{M}$  ( $0,78 \pm 0,07$  mmol) und der Mixtur 120  $\mu\text{M}$  ( $0,83 \pm 0,12$  mmol). Bei der Gruppe 7- $\beta$ -OH lagen die Werte der verschiedenen Konzentrationen eng zusammen.



**Abbildung 14: TAC-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs**

### 4.3.3 Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation

Bei einer Inkubationszeit von 120 min zeigte sich eine Streuung der Ergebnisse (Abbildung 15). Hier lagen die Werte sowohl unter als auch über dem Ausgangswert des Emulgators. Mixtur 30  $\mu\text{M}$  ( $0,79 \pm 0,36$  mmol) zeigte die höchste nicht signifikante Erhöhung im Vergleich zum Emulgator ( $0,67 \pm 0,07$  mmol).

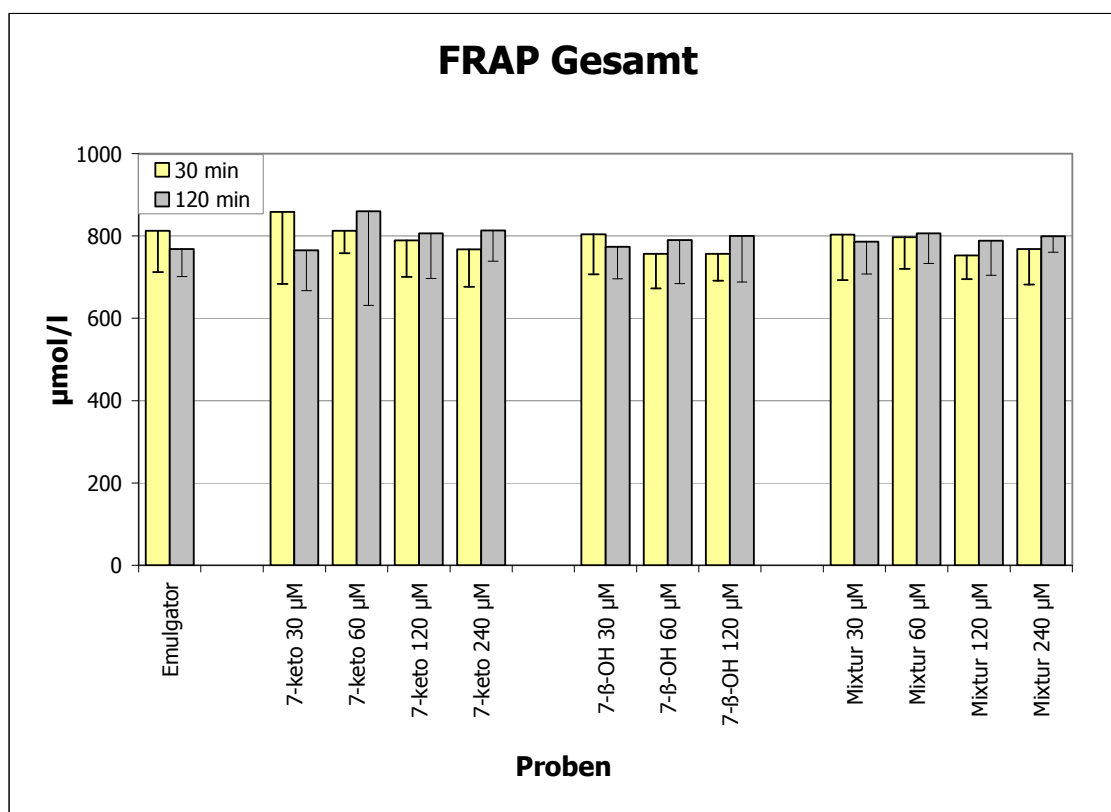


**Abbildung 15: TAC-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs**

## 4.4 Ferric Reducing Antioxidant Power Assay FRAP

### 4.4.1 Gesamtergebnisse von FRAP

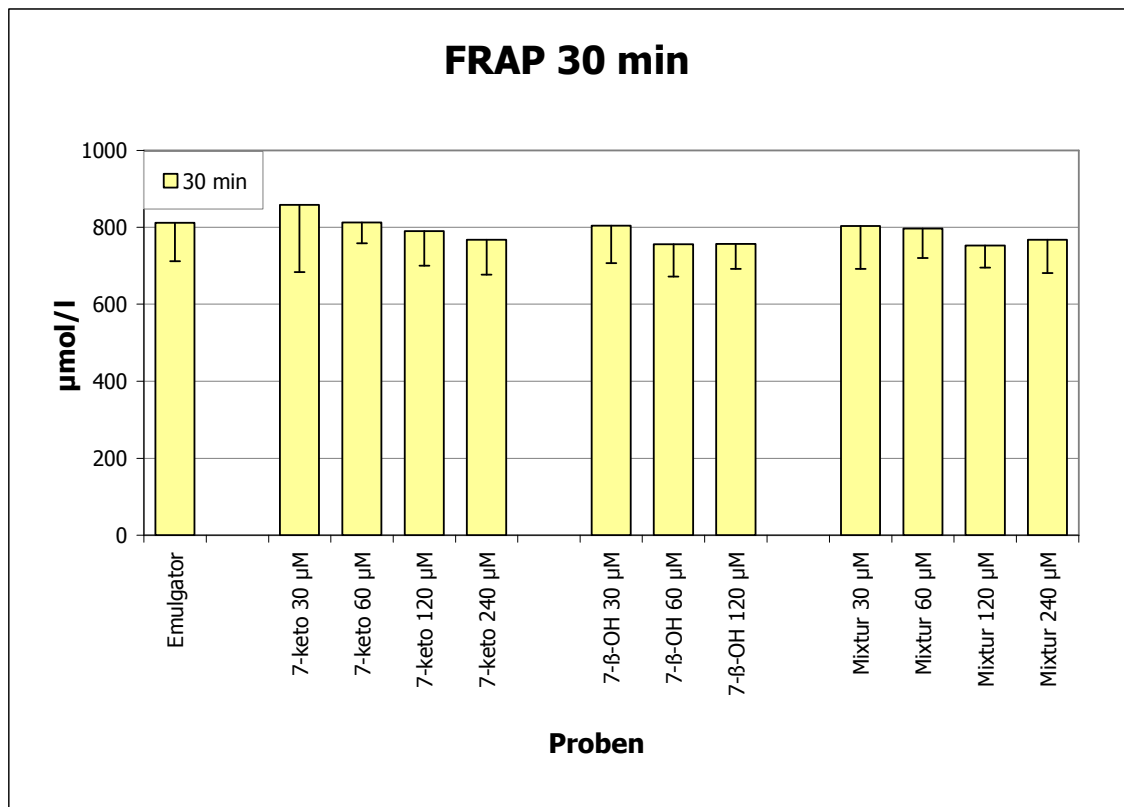
Bei der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse (Abbildung 16) von 30- und 120-minütigen Inkubationszeiten zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Die Werte lagen zwischen  $752,6 \pm 57,2 \mu\text{mol/l}$  (Mixtur 120  $\mu\text{M}$  – 30 min) und  $860,4 \pm 228,7 \mu\text{mol/l}$  (7-Keto 60  $\mu\text{M}$  – 120 min). Allgemein kann daraus geschlossen werden, dass Phytosteroloxidaionsprodukte weder antioxidativ noch prooxidativ wirken.



**Abbildung 16: Vergleich der FRAP-Werte nach einer Inkubationszeit von 30 min und 120 min mit POPs**

#### 4.4.2 Ergebnisse nach 30-minütiger Inkubation

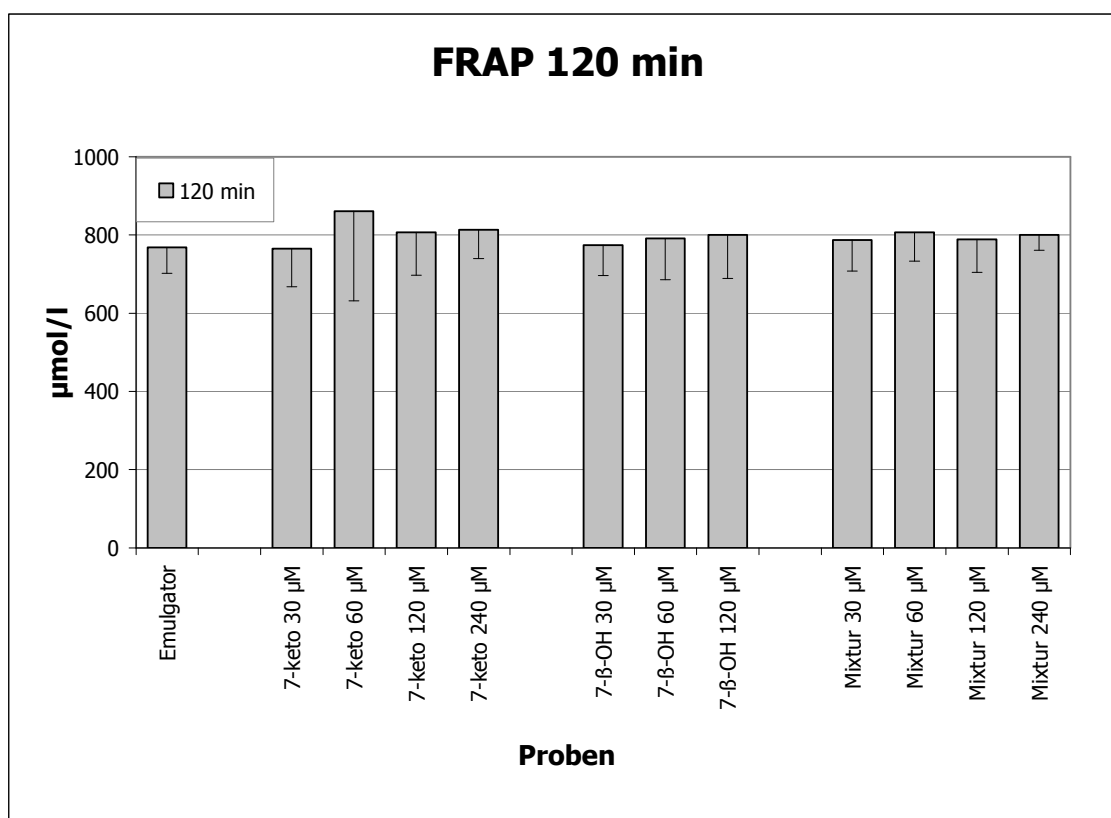
Tendenziell lagen die Werte bei einer Inkubationszeit (Abbildung 17) von 30 min unter dem Gesamtwert ( $812,3 \pm 100,0 \mu\text{mol/l}$ ) des Emulgators. 7-Keto  $30 \mu\text{M}$  ( $858,4 \pm 175,0 \mu\text{mol/l}$ ) war der einzige Wert, der über dem Wert des Emulgators lag, jedoch hatte er eine relativ hohe Standardabweichung. Bei 7-Keto lässt sich eine leichte Abnahme der FRAP-Werte mit höher werdender Konzentration erkennen.



**Abbildung 17: FRAP-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 30-minütiger Inkubation mit POPs**

## 4.4.3 Ergebnisse nach 120-minütiger Inkubation

Das Ergebnis bei einer Inkubationszeit von 120 min war genau dem Ergebnis mit einer Inkubationszeit von 30 min entgegengesetzt (Abbildung 18). Die Werte lagen generell über dem Ausgangswert ( $768,4 \pm 66,8 \mu\text{mol/l}$ ) des Emulgators. Alle Werte bis auf 7-Keto 30  $\mu\text{M}$  ( $765,4 \pm 98,0 \mu\text{mol/l}$ ) waren höher als die FRAP-Konzentration in der Probe mit Emulgator.



**Abbildung 18: FRAP-Werte im Vergleich zum Mittelwert des Emulgators nach 120-minütiger Inkubation mit POPs**

### **5. SCHLUSSBETRACHTUNG**

Es gibt bereits sehr viele Studien, die den positiven Einfluss von Phytosterolen auf einen erhöhten Cholesterolspiegel beobachteten. Jedoch wird erst seit den letzten Jahren auch das Thema POPs erforscht. Diese Studien basieren vor allem auf in vitro-Studien in Zellkulturen.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob POPs im Humanblut nach in vitro-Inkubation eine mögliche Auswirkung auf oxidative Parameter haben. Phytosterole kommen vermehrt in fettreichen pflanzlichen Lebensmitteln vor (Sonnenblumenkerne, Maiskeimlinge). Eine der natürlichen Hauptquellen für Phytosterole sind pflanzlichen Öle, aber auch Getreidekörner und Nüsse. Diese Produkte sowie auch funktionelle Lebensmittel, denen Phytosterole zugesetzt wurden, sind oft oxidativen Prozessen ausgesetzt z. B. Hitze, Luft, Licht und Strahlung. Die daraus entstehenden POPs, die dann mit der Nahrung aufgenommen werden, könnten einen möglicherweise negativen Einfluss auf die Gesundheit des Menschen haben.

In dieser Arbeit wurden drei Methoden (MDA, TAC, FRAP) für die Erfassung der oxidativen Parameter verwendet. Um eine Schädigung der Erythrozyten auszuschließen, wurde die Hämoglobinbestimmung durchgeführt. Es wurden drei Oxidationsprodukte von  $\beta$ -Sitosterol (7-Ketositosterol, 7- $\beta$ -OH-Sitosterol und eine Mixtur) für die Analyse verwendet. Aus diesen POPs wurden unterschiedliche Konzentrationen (30  $\mu$ M – 240  $\mu$ M) hergestellt. Diese Konzentrationen wurden dem entnommenen Vollblut von 5 Probandinnen zugesetzt und für 30 bzw. 120 min inkubiert. Für die verschiedenen Untersuchungen wurde das durch Zentrifugation gewonnene Plasma, herangezogen.

## SCHLUSSBETRACHTUNG

---

Bei MDA zeigte sich, dass die Mixtur 120  $\mu\text{M}$  - 30 min ( $2,87 \pm 0,76 \mu\text{mol/l}$ ) signifikant erhöht war im Vergleich zur Inkubationszeit von 120 min ( $1,96 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$ ). Bei der Inkubationszeit von 120 min waren Mixtur 120 ( $1,96 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$ ) und 240  $\mu\text{M}$  ( $1,99 \pm 0,39 \mu\text{mol/l}$ ) signifikant niedriger als das, mit Emulgator ( $2,67 \pm 0,48 \mu\text{mol/l}$ ) versetzte Blut. TAC zeigte bei einer Inkubationszeit von 30 min zwei Werte Mixtur 30 ( $0,78 \pm 0,07 \text{ mmol}$ ) und 120  $\mu\text{M}$  ( $0,83 \pm 0,12 \text{ mmol}$ ), die signifikant höher waren als die Kontrolle Emulgator ( $0,68 \pm 0,05 \text{ mmol}$ ).

Die durchgeführten Analysen zeigten tendenziell keine negativen oder positiven Veränderungen bezogen auf die Emulgator-Kontrolle. Bei allen Messmethoden lag zwischen den zwei Inkubationszeiten keine einheitliche Steigerung oder Senkung der Werte vor. Die Hämoglobinwerte zeigten, dass keine Hämolyse statt fand.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass POPs weder pro- noch antioxidativ nach Inkubationen in Vollblut wirken.



**6. ZUSAMMENFASSUNG**

Menschen mit einem erhöhten Cholesterolspiegel sind einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen ausgesetzt. Phytosterole spielen eine wichtige Rolle bei der Senkung des erhöhten Cholesterolspiegels. Diese werden im Gegensatz zu Cholesterol nicht vom Körper selbst synthetisiert, sondern müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Durch oxidative Einflüsse, denen Phytosterole in Lebensmitteln ausgesetzt sein können, entstehen Phytosteroloxidaionsprodukte (POPs). Diesen Oxidationsprodukten wird eine toxische Wirkung in Bezug auf Körperzellen zugesprochen. Daher war es Ziel dieser Studie mögliche negative Effekte von POPs auf oxidative Parameter im humanen Vollblut (in vitro) zu untersuchen.

Für diese Arbeit wurde das Vollblut von fünf Probandinnen mit POPs versetzt, für 30 oder 120 min mit unterschiedlichen Oxidationsprodukten (7-Ketositosterol, 7- $\beta$ -OH-Sitosterol und einer Mixtur gelöst in Emulgator) und unterschiedlichen Konzentrationen (30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 120  $\mu$ M und 240  $\mu$ M) inkubiert. In der Gruppe 7- $\beta$ -OH-Sitosterol wurden nur Konzentrationen bis 120  $\mu$ M untersucht. Malondialdehyd (MDA), die totale antioxidative Kapazität (TAC) und Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) wurde im Plasma bestimmt.

Nur die Mixtur von drei verschiedenen POPs zeigte eine signifikante Änderung der oxidativen Parameter. Die MDA-Konzentration der Mixtur 120  $\mu$ M – 30 min war signifikant höher als jene mit einer Inkubationszeit von 120 min. Bei der Inkubationszeit von 120 min waren die MDA-Konzentrationen der Mixtur 120 und 240  $\mu$ M signifikant niedriger als die des Emulgators. TAC zeigte bei einer Inkubationszeit von 30 min bei der Mixtur mit der Konzentration 30 und 120  $\mu$ M signifikant höhere Werte als der Emulgator. 7-Ketositosterol und 7- $\beta$ -OH-Sitosterol zeigten bei keiner Methode einen Einfluss.

Obwohl es vereinzelt zu geringen Erhöhungen oder Erniedrigungen bei den Werten kam, konnte bei keinem der angewandten Tests ein Einfluss der POPs auf oxidative Parameter gezeigt werden. Somit kann eine mögliche pro-oxidative Wirkung der POPs im Humanblut nach in vitro Inkubation ausgeschlossen werden.

### **7. SUMMARY**

People with high blood-cholesterol have a higher risk of cardiovascular diseases. Phytosterols are not synthesised in the body such as cholesterol, they have to be supplied by the food. But phytosterols are susceptible to oxidation due to heat, light, oxygen or radiation which results in the formation of phytosterol oxidation products (POPs). These oxidation products are discussed to have cytotoxic effects. Therefore the aim of this master thesis was to investigate possible negative effects of POPs on oxidative parameters in human blood samples after in vitro incubation.

Blood samples of five subjects were taken and incubated for 30 or 120 minutes with three different oxidation products (7-ketositosterol, 7- $\beta$ -OH-sitosterol and a mixture of three different POPs dissolved in an emulsifier) at different concentrations (30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 120  $\mu$ M and 240  $\mu$ M). The influence of 7- $\beta$ -OH-sitosterol was determined at concentrations of 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 120  $\mu$ M. Plasma was analysed for malondialdehyd (MDA), total antioxidative capacity (TAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).

Only the mixture of three different POPs caused significant changes of oxidative parameters. MDA values of the mixture 120  $\mu$ M – 30 min were significantly higher compared to the mixture incubated for 120 min. The MDA-concentration of the mixture 120 and 240  $\mu$ M incubated for 120 min was significantly lower than the blood only with the emulsifier. TAC showed after an incubation of 30 min at the concentrations of 30 and 120  $\mu$ M significant higher values than the emulsifier. 7-Ketositosterol and 7- $\beta$ -OH-Sitosterol showed no influence on any of the oxidative parameters.

These in vitro tests showed no definite influence of POPs on oxidative parameters. Therefore the results of this study indicate that POPs do not have any prooxidative effects in human blood after in vitro incubation.

<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>
-----------------------------

- Anderson, R.J.** (1926a), 'The Phytosterols of Corn Oil', *Journal of the American Chemical Society* 48, 2976–2986.
- Anderson, R.J.** (1926b), 'The Phytosterols of Wheat Germ Oil', *Journal of the American Chemical Society* 48, 2987–2996.
- Apprich, S. and Ulberth, F.** (2004), 'Gas chromatographic properties of common cholesterol and phytosterol oxidation products', *Journal of Chromatography A*, 1055, 1-2, 169-176.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J.** (1996), 'The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay', *Analytical Biochemistry*, 239, 1, 70-76.
- Blair, S., Capuzzi, D., Gottlieb, S., Nguyen, T., Morgan, J. and Cater, N.** (2000), 'Incremental Reduction of Serum Total Cholesterol and Low-Density Lipoprotein Cholesterol With the Addition of Plant Stanol Ester-Containing Spread to Statin Therapy', *The American Journal of Cardiology*, 86, 46-52.
- Bosner, M.S., Lange, L.G., Stenson, W.F. and Ostlund, R.E., Jr.** (1999), 'Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry', *Journal of Lipid Research*, 40, 2, 302-308.
- Burian, R.** (1897), 'Über Sitosterin. Ein Beitrag zur Kenntniss der Phytosterine', *Monatshefte für Chemie*, 18.
- Child, R.B., Wilkinson, D.M., Fallowfield, J.L. and Donnelly, A.E.** (1998), 'Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run', *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30, 11, 1603-1607.

- Conchillo, A., Cercaci, L., Ansorena, D., Rodriguez-Estrada, M.T., Lercker, G. and Astiasaran, I.** (2005), 'Levels of phytosterol oxides in enriched and nonenriched spreads: application of a thin-layer chromatography-gas chromatography methodology', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 20, 7844-7850.
- De Jong, A., Plat, J., Bast, A., Godschalk, R.W., Basu, S. and Mensink, R.P.** (2008), 'Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment', *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 2, 263-273.
- Elmadfa, I.** (2004), *Ernährungslehre*, Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
- Elmadfa, I. and Leitzmann, C.** (2004), *Ernährung des Menschen*, Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
- Fasching, P., Bernecker, P. and Schneider, B.** (2001), 'Österreichische Anwendungsbeobachtung mit einer phytosterinangereicherten Diät-Halbfettmargarine (becel "pro-activ") bei Personen mit erhöhtem Cholesterinspiegel', *Journal für Ernährungsmedizin*, 3, 20-23.
- Gebhard, J.** (2008), 'Cholesterinsenker aus dem Kühlregal', *Kurier*.
- Guardiola, F.** (2004), 'Phytosterol oxidation products: state of the art', *Reproduction Nutrition Development*, 44, 6, 597-598.
- Guardiola, F., Dutta, P., Codony, R. and Savage, G.** (2002), 'Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects', *Journal of AOCS International*, 335-374.
- Hallikainen, M., Sarkkinen, E., Erkkilä, A., Uusitupa, M. and Gylling, H.** (2000), 'Comparison of the effects of plant sterol ester and plant stanol ester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet', *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 715-725.
- Hendriks, H., Vliet, T., Weststrate, J. and Meijer, G.** (1999), 'Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly

hypercholesterolaemic subjects', *European Journal of Clinical Nutrition*, 53, 319-327.

**Igel, M., Giesa, U., Lütjohann, D. and Bergmann, K.** (2003), 'Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice', *Journal of Lipid Research*, 44, 533-538.

**Ikeda, I. and Sugano, M.** (1978), 'Comparison of absorption and metabolism of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats', *Atherosclerosis*, 30, 3, 227-237.

**Jones, P., Raeini-Sarjaz, M., Ntanios, F., Vanstone, C., Feng, J. and Parsons, W.** (2000), 'Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters', *Journal of Lipid Research*, 41, 697-705.

**Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T. and Paoletti, R.** (2003), 'Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels', *Mayo Clinic Proceedings*, 78, 8, 965-978.

**Kiefer, I., Haberzettl, C., Panuschka, C. and Rieder, A.** (2002), 'Phytosterine und ihr Bedeutung in der Prävention', *Journal für Kardiologie*, 9, 96-101.

**Koschutnig, K., Heikkinen, S., Kemmo, S., Lampi, A.M., Piironen, V. and Wagner, K.H.** (2009), 'Cytotoxic and apoptotic effects of single and mixed oxides of ss-sitosterol on HepG2-cells', *Toxicol In Vitro*, in press.

**Lambelet, P., Grandgirard, A., Gregoire, S., Juaneda, P., Sebedio, J.L. and Bertoli, C.** (2003), 'Formation of modified fatty acids and oxyphytosterols during refining of low erucic acid rapeseed oil', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 15, 4284-4290.

**Law, M.** (2000), 'Plant sterol and stanol margarines and health', *British Medical Journal*, 320, 7238, 861-864.

**Lea, L.J., Hepburn, P.A., Wolfreys, A.M. and Baldrick, P.** (2004), 'Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and

subchronic toxicity with phytosterol oxides', *Food and Chemical Toxicology*, 42, 5, 771-783.

**Lees, A.M., Mok, H.Y.I. and Lees, R.S.** (1977), 'Plant sterols as cholesterol lowering agents: Clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance', *Atherosclerosis*, 28, 3, 325-338.

**Lutjohann, D.** (2004), 'Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols', *British Journal of Nutrition*, 91, 1, 3-4.

**Osada, K.** (2002), 'Cholesterol oxidation products: Other biological effects. In: Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects', *AOCS Press, Champaign, Illinois*, 278-318.

**Ostlund, R.E., Jr.** (2002), 'Phytosterols in human nutrition', *Annual Review of Nutrition*, 22, 533-549.

**Peterson, D.W.** (1951), 'Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 78, 1, 143-147.

**Piironen, V., Lampi, A., Toivo, J., Lindsay, D. and Miettinen, T.** (2000), 'Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.

**Piironen, V., Toivo, J., Puupponen-Pimiä, R. and Lampi, A.** (2003), 'Plant sterols in vegetables, fruits and berries', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 330-337.

**Pollak, O.J.** (1953), 'Reduction of blood cholesterol in man', *Circulation*, 7, 5, 702-706.

**Rice-Evans, C. and Miller, N.J.** (1994), 'Total antioxidant status in plasma and body fluids', *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.

**Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A.R. and O'Brien, N.M.** (2005), 'Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products', *British Journal of Nutrition*, 94, 3, 443-451.

- Sanders, D.J., Minter, H.J., Howes, D. and Hepburn, P.A.** (2000), 'The safety evaluation of phytosterol esters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat', *Food and Chemical Toxicology*, 38, 6, 485-491.
- SCF, E.U.S.C.o.F.** (2000), 'Opinion of the Scientific Committee on Food on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads', *SCF/CS/NF/DOS/1 Final*.
- Schoenheimer, R.** (1931), 'New Contributions in Sterol Metabolism', *Science*, 74, 1928, 579-584.
- Schroepfer, G.J., Jr.** (2000), 'Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes', *Physiological Reviews*, 80, 1, 361-554.
- Soupas, L.** (2006), 'Oxidative stability of phytosterols in food models and foods', *Dissertation*.
- Trautwein E. A., Duchateau G. S. M. J. E., Lin Y., Mel'nikov S. M., Molhuizen H. O. F. and Y., N.F.** (2003), 'Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 171–185.
- Valentini, J.** (2009), 'Entwicklung einer Mikrotiterplatten basierten Methode zur Bestimmung der Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)', *Diplomarbeit*.
- Van Kampen, E. and Zijlstra, W.G.** (1961), 'Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method', *Clinica Chimica Acta* 6, 4, 538-544.
- Wallis, E.S. and Fernholz, E.** (1936), ' $\alpha$ -Sitosterol', *Journal of the American Chemical Society* 58, 2446–2448.
- Watzl, B. and Leitzmann, C.** (1999), *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*, Stuttgart, Hippokrates Verlag.
- Weihrauch, J.L. and Gardner, J.M.** (1978), 'Sterol content of foods of plant origin', *Journal of the American Dietetic Association*, 73, 1, 39-47.
- Wolfs, M., De Jong, N., Ocké, M.C., Verhagen, H. and Monique Verschuren, W.M.** (2006), 'Effectiveness of customary use of

phytosterol/-stanol enriched margarines on blood cholesterol lowering', *Food and Chemical Toxicology* 44, 10, 1682-1688.

**Wong, S.H.Y., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, C.N. and Sunderman, F.W.** (1987), 'Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct', *Clinical Chemistry*, 33, 2, 214-220.

**Yanishlieva, N. and Marinova, E.** (1980), 'Autoxidation of sitosterol. Kinetic studies on free and esterified sitosterol ', *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 57, 477-480.



## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten:**

Name: Isolde Wastian  
Geburtsdatum: 12. Jänner 1981  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Familienstand: ledig  
Eltern: Franz und Irmgard Wastian

### **Ausbildungsdaten:**

1987-1991 Volksschule Reisach  
1991-1995 Musikhauptschule Kötschach-Mauthen  
1995-2001 Höhere Bundeslehranstalt für wirtschaftliche Berufe  
in Villach, Schwerpunkt: Ernährung und  
Betriebswirtschaft  
2001-2002 Akademie für medizinisch-technische Assistentin  
Seit Oktober 2002 Studium der Ernährungswissenschaften an der  
Universität Wien

### **Berufliche Erfahrungen:**

April – Dezember 2006 Edith Kubiena Diaetologin  
Februar 2007 AKE – Nutrition Day  
April 2007 Praktikum bei der ÖGE  
Juni 2007 Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften  
der Universität Wien  
August 2007 Praktikum am Institut für Ernährung der  
Veterinärmedizinischen Universität Wien  
Juli 2008 Praktikum bei der Firma Atotech  
WS 2008, SS 2009 Tutorium bei den Ernährungslehreübungen